

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN
VON R-FAKTOR-TRAGENDEN UND
COLICINBILDENDEN ENTEROBACTERIACEAE
IN FUTTERMITTELN**

Petra I. Ziebold
—

1972
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON R-FAKTOR-
TRAGENDEN UND COLICINBILDENDE ENTEROBACTERIACEAE
IN FUTTERMITTELN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Petra I. Ziebold
aus
Celle

München 1972

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München



Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. von Sandersleben

Tag der Promotion: 14. Juli 1972

meinen Eltern
in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1. Vorkommen von Enterobacteriaceae in Futter- mitteln	2
2.2. Antibiotika und Chemotherapeutika in der Tier- ernährung	9
2.3. Resistenz gegenüber Antibiotika und Sulfonami- den	13
2.3.1. Angeborene, natürliche Spezies- oder Gattungsresistenz	13
2.3.2. Erworbene, primäre oder sekundäre Resistenz	14
1. Spontane Änderung im Genom	14
2. Übertragbare Resistenz	16
Transformation	16
Transduktion	16
Konjugation	17
chromosomal	17
episomal	17
2.4. Colicine	24
3. Material und Methode	32
3.1. Anzüchtung und Isolierung von Enterobacteria- ceae aus Futtermitteln	32
3.2. Differenzierung der isolierten Enterobacteria- ceae	35
3.3. Antibiotika-Resistenz-Bestimmung	39
3.4. Resistenzdepression mittels Trypaflavin	40
3.5. Untersuchungen über gleichzeitiges Auftre- ten von Colicinogenie und Antibiotikaresistenz	40
4. Versuche und Ergebnisse	44
4.1. Anzüchtung und Isolierung von Enterobacteria- ceae aus Futtermitteln	44
4.2. Differenzierung der isolierten Enterobacteria- ceae	49
4.3. Antibiotika-Resistenz-Bestimmung	53

II

4.4. Resistenzdepression mittels Trypaflavin	62
4.5. Untersuchungen über gleichzeitiges Auftreten von Colicinogenie und Antibiotika-Resistenz	62
5. Diskussion	66
6. Zusammenfassung	73
7. Literaturverzeichnis	75
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Die episomal übertragbare Antibiotikaresistenz bei der Gattung Enterobacteriaceae ist weltweit als Problem erkannt worden, seit sie durch japanische Forscher im Jahre 1959 entdeckt wurde.

Im November 1969 publizierte das "Joint Committee on the use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine" den als "SWANN COMMITTEE" bekannten Bericht an den britischen Landwirtschaftsminister, in dem weitreichende Restriktionen bezüglich der Anwendung bestimmter Antibiotika und anderer antibakteriell wirksamer Stoffe im Tierfutter empfohlen werden.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen ist es festzustellen, ob in den untersuchten Futtermitteln R-Faktor-tragende Enterobacteriaceae nachzuweisen sind und ob sich eine Beziehung zwischen R-Faktoren und col-Faktoren aufzeigen läßt.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Vorkommen von Enterobacteriaceae in Futtermitteln

Die einzelnen Handelsfuttermittel weisen in frischem Zustand einen jeweils ihnen spezifischen Gesamtkeimgehalt an Mikroorganismen auf (HÖRTER, 1968). Das Vorkommen von Mikroorganismen in Futtermitteln ist das Ergebnis von Besiedelungs- und Infektionsvorgängen, die ständig in der Natur ablaufen (SCHMIDT, 1968). So setzt sich der Keimgehalt der Futtermittel aus variierenden Populationen von Mikroorganismen zusammen. Die Besiedelung bzw. Verunreinigung kann über die Mikroflora des Bodens, der Luft und des Wassers, sowie die Oberflächen der Blätter, Früchte und Samen der Pflanzen, aus denen Futtermittel gewonnen werden, ferner über die Mikroflora der Verarbeitungsstätten, Lagerplätze und Transportwege erfolgen; auch die Intestinalflora des Tieres kommt hier in Betracht (SCHMIDT, 1968).

SCHMIDT, 1968, unterscheidet in Bezug auf Rohstoffe und Verarbeitungsgrad:

- "1. Rohstoffe mit natürlichem, vielseitig zusammengesetztem, oft organismenreichem Keimbesatz, z.B. Getreidekörner und -schrote.
2. Einfach bearbeitete Futterstoffe mit zahlen- und artenmäßig reduzierter Primärflora wie bei geschälten, ausgepressten und extrahierten Produkten, z.B. Mühlennachprodukten (ohne Kleien) und manchen Ölsaatrückständen.
3. Weitgehend bearbeitete und erhitzte Stoffe, die sterilisiert, mit Heißdampf behandelt oder auch getoastet wurden, wie Tier-, Knochen-, Fischmehle und Sojaschrot, sowie solche Produkte, die aus praktisch keimfreiem Ausgangsmaterial gewonnen wurden, wie etwa Sprühmehle aus gesundem Blut. Ihre Mikroflora kommt überwiegend durch spätere Keimverunreinigungen zustande und kann somit als Sekundärflora angesprochen werden.

4. Pressfutter (Pellets) nimmt eine Mittelstellung zwischen der Gruppe 2 und 3 ein; seine Futterkomponenten werden meistens verschieden hoch erhitzt. Daher stellt ihr Keimgehalt eine Reliktflora dar, die den Erhitzungsvorgang überlebte, oder geht auf einen Befall der Pelletoberflächen zurück, welcher als nachträgliche Infektion anzusehen ist."

In vielen Fällen ist die Mikroflora der Futtermittel recht vielseitig zusammengesetzt, und es läßt sich nur schwer feststellen, welcher Keimgehalt den einzelnen Futterkomponenten primär zuzuordnen ist (SPICHER, 1969).

Durch die Bearbeitung von Getreidekörnern (Entfernung der Fruchtwand, usw.) wird die Mikroflora guter Boll- und Futtermehle jedoch erheblich reduziert, sodaß die Keimverunreinigung anderer Herkunft leichter festzustellen ist (SCHMIDT, 1965). Keimverunreinigungen von Eiweißfuttermitteln (Gruppe 3) können fast immer erkannt werden, da sie im frischen Zustand sehr organismenarm sind und nur die technisch vermeidbaren Keimmengen enthalten (SCHMIDT, 1965).

Pelletiertes Futter weist seiner Herstellungstechnik nach naturgemäß einen geringeren Restkeimgehalt auf. So gibt HÖRTER, 1968 folgende Keimzahlen an:

- | | |
|---------------------|---|
| 1. Unpell.Futterpr. | Keimzahlen von 250.000 - 4Millionen Keime/g |
| 2. Pellets Ø 10mm | " " 100 - 46.000 " /g |
| 3. Pellets Ø 4mm | " " 100 - 20.000 " /g |

Bei der Beurteilung des Gesamtkeimgehaltes muß unbedingt die Futterart bzw. die Futterzusammensetzung berücksichtigt werden (SCHMIDT, 1965). Man findet z.B. in Futtermitteln mit vorwiegend Getreideanteilen sogenannte "Gelbstämme", die besonders typisch für "gesunde" Getreideprodukte sind (SCHMIDT, 1965; SPICHER, 1966). Diese häufig auftretenden Epiphyten der höheren grünen Pflanzen wurden von älteren Autoren als *Bacterium herbicola* A, B und D, *Bacterium aureus* und *Flavobacterium trifolii* bezeichnet. MACH stellte im Jahre 1936/37 fest, daß die als *Bacterium herbicola* und *Flavobacterium trifolii* beschriebenen Bakterien identisch sind und bezeichnete die "Gelbstämme" als "*Flavobacterium herbicola* Burri und Duggeli". Bis heute gibt es für diese "Gelbstämme" keine einheitliche Nomenklatur. SCHMIDT, 1965, und SPICHER, 1963, setzten sie mit der Spezies "*Xanthomonas trifolii*" gleich und geben ihren Anteil in Mischfuttern mit überwiegendem Pflanzenanteil mit ca. 50 - 83% an. HÖRTER, 1968, und HILLIGER, 1969, bestätigen diese Zahlen, stellen jedoch fest, daß ein wesentlicher Anteil auf Mikrokokken und andere Spezies entfällt.

Bei stark verschimmelten Futterproben ist die Bakterienzahl erheblich reduziert bzw. sind überhaupt keine Bakterien mehr

nachzuweisen. Dieses Phänomen stellte schon GORDAN 1904 in Kleien fest; er wies bei schimmelnden Kleien in den meisten Fällen eine geringere Bakterienzahl nach als bei nicht schimmelnden Proben.

Aus diesen Beobachtungen folgt, daß sich a.) durch das Verhältnis von Bakterienzahl und Pilzzahl und b.) durch das Verhältnis der Gesamtbakterienzahl zur Zahl der "Gelbstämme" eine Aussage hinsichtlich des allgemeinen mikrobiologischen Zustandes eines Futtermittels machen läßt.

Der "spezielle mikrobiologische Zustand" eines Futtermittels dürfte durch folgende Punkte, wie sie für das SPF-Futter aufgestellt wurden, gekennzeichnet sein:

1. Freisein von allen nicht sporenbildenden Bakterien,
 2. Freisein von Pilzen aller Art,
 3. Freisein von obligat anaerobwachsenden Sporenbildnern,
 4. Freisein von mäusepathogenen Bacillen,
 5. Unterscheidung der Gesamtkeimzahl, deren Höhe von dem Stand der Aufbereitungs- und Herstellungstechnik abhängt.
- Die Verunreinigung der Handelsfuttermittel mit Infektionserregern, unter denen besonders Enterobacteriaceae gefunden werden, läßt auf mangelnde Futterhygiene schließen. SCHMIDT, 1968, veröffentlichte eine Zusammenfassung über das Vorkommen von *Escherichia coli* in Futterproben, die aus der praktischen Landwirtschaft zur Untersuchung eingesandt worden waren:

Tabelle Nr. 2

Escherichia coli in Handelsfuttermitteln:
(nach SCHMIDT, 1968)

	Anzahl der Proben		E.coli +	E.coli%
Hühnerfutter:				
Legehennen	54		11	
Mastgeflügel	3	64	1	20,3
Küken	7		1	
Schweinefutter:				
Sauen	31		13	
Ferkel	15	46	1	30,4
Eiweißfutter:				
EW-Konzentrate	13	25	2	16,0
Fischmehle	12		2	
Proben				
insgesamt:	135		31	22,9

Obwohl bei den einzelnen Futtermittelarten eine unterschiedliche Anzahl von Proben untersucht wurde, geht aus der Tabelle hervor, daß E.coli relativ häufig in Futtermitteln auftritt. In den von ihm untersuchten Futtermitteln fand SCHMIDT (1968) insgesamt ca. 23% E.coli-Stämme. Außerdem stellte er fest, daß Enterobakterien der Gattung Citrobacter häufig in Handelsfuttermitteln z.T. in Vergesellschaftung mit E.coli auftreten. In Verbindung mit stark erhöhtem Schimmelpilzbefall kam es bei der Verfütterung derartiger Futtermittel zu erheblichen Verlusten und Gesundheitsstörungen.

2.2. Antibiotika und Chemotherapeutika in der Tierernährung

STOKSTAD und JUKES entdeckten 1950, daß Chlortetracyclin, dem Futter in geringen Dosen beigemischt, einen wachstumsfördernden Effekt bei Küken zeigte. Daraufhin fanden Antibiotika und Chemotherapeutika seit 1950 in der Fütterung für landwirtschaftliche Nutztiere allgemeine Anwendung (KISER, J.S. et al., 1969 und 1970)

Chemotherapeutika und Antibiotika sind wesensverwandte Stoffgruppen, deren Wirkung zwar ähnlich, deren Herkunft jedoch verschieden ist. Die Chemotherapeutika im engeren Sinne stammen aus der Retorte des Chemikers; dagegen sind die Antibiotika chemische Substanzen, die in der lebenden Natur als Produkte von Pilzen, Bakterien und Pflanzen aufgefunden werden und in der Lage sind, das Wachstum und die Entwicklung anderer Mikroorganismen zu hemmen. (MANSON, 1968; WALTER und HEILMEYER, 1969) Heute gibt es eine quantitativ kaum noch zu überschauende Menge wissenschaftlicher Publikationen, die den Wert der wachstumsfördernden Wirkung der Antibiotika nachgewiesen haben (FEEDSTUFFS, 1969).

In Deutschland werden zur Zeit nach KEWITZ, 1970 den Futtermitteln Antibiotika in der Dosierung von 5-50ppm, bezogen auf das Alleinfutter, beigemischt. Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Bacitracin und Oleoandomycin dürfen nach den derzeitigen futterrechtlichen Vorschriften dem Küken-, Ferkel-, Schweine- und Kälberfutter zugesetzt werden (ENTEL, 1970).

In anderen Ländern, einschließlich den der EWG beigetretenen Staaten, werden weitaus mehr Antibiotika verwendet.

Der gewünschte wachstumsfördernde und die Futterverwertung steigernde Effekt kleiner Antibiotikadosen, der zu einer jährlichen Futtereinsparung von ca. 15 Millionen Tonnen beiträgt (Gedanken zum SWANN - REPORT, 1970), geht sicher nicht von einigen bestimmten Antibiotika aus, sondern gehört zu den charakteristischen Wirkungen dieser Stoffklasse (BÜRGY, 1970). TIEWS, 1970, gibt für die meisten Zweige der

Nutztierhaltung durch den Zusatz von Antibiotika zum Futter eine Ertragssteigerung von durchschnittlich 5-10% an. Er stellt wie LIENERT (1970), JUKES (1966 u. 1970) und MERKENSCHLAGER (1965) die Wirkung der Fütterungsantibiotika Chlortetracyclin und Oxytetracyclin besonders für Kälber und Ferkel in den frühen Lebensabschnitten in den Vordergrund, da das zur Mast aufgestellte Tiermaterial meist inhomogen und daher besonders infektions-, transport- und umweltgefährdet ist, sodaß allein durch eine Antibiotika-beifütterung von 80 ppm im Ferkelaufzuchtsfutter und 120 ppm im Milchaustauscher für Kälber ein erfolgreicher Ausgang der Mast gewährleistet werden kann (TIEWS, 1970).

Der nutritive Effekt der Antibiotika-beifütterung bei Nutztieren wird messbar als Wachstumsbeschleunigung und verbesserte Futterverwertung, er variiert aber in Abhängigkeit vom Grad der Konkurrenzsituation zwischen Tier und bakteriellem Milieu. Hierbei sind Haltung, Hygiene, Ernährung, Alter und Exposition der Tiere wesentliche Faktoren für die Ertragssteigerungsrate (JUKES, 1966 u. 1970). Bei der kontinuierlichen Anwendung von Antibiotika in der Tierernährung spielt neben der wachstumsfördernden die vorbeugende Wirkung im Hinblick auf die Kontrolle subklinischer Dysbakterien im gesunden Tier eine wesentliche Rolle (MANSON, 1968). Die Antibiotika verhindern (nach HAENEL, 1964) die Bildung schädlicher bakterieller Metaboliten, sodaß durch ihre Beifütterung die Nähr- und Wirkstoffe besser resorbiert werden.

Die Abwehr- und Schutzmechanismen des Darmes, besonders des Dünndarmes, werden gegenüber schädlichen Mikroorganismen verbessert, sodaß sich Dysbakterien erst gar nicht manifestieren können. Dies erlaubt wiederum eine wirtschaftlich effektvollere Ausnutzung sowohl der angebotenen Nahrung als auch des Stallraumes (JUKES, 1970). Deswegen ist es heute der modernen Tierproduktion möglich, mit einer hohen Tierbesatzdichte zu arbeiten, die vor dem Einsatz der Antibiotika in die Tierernährung nie denkbar gewesen wäre (Gedanken zum SWANN - Report, 1970).

Nachdem japanische Forscher Ende der 50er Jahre die durch Enterobacteriaceae übertragene Antibiotikaresistenz entdeckt hatten (WATANABE et al., 1950), wurden immer mehr Stimmen laut (SWANN - REPORT, 1969 u. 1970; SMITH, H.W., 1968 u. 1970; ANDERSON, 1965 u. 1969; DATTA, 1965 u. 1969; KNOTHE, 1963 u. 1967; GUINEE, 1968 u. 1971; LEBEK, 1969; BISPING, 1963; GOUNELLE, H., 1968, u.a.), die auf Grund gesammelter Erfahrungen befürchteten, daß durch die Anwendung der Antibiotika in der Tierernährung, Populationen neuer Krankheitserreger auftreten und den bekannten therapeutischen Methoden widerstehen könnten (KISER et al., 1970). Die zunehmende Verbreitung chemoresistenter Krankheitserreger, durch die der therapeutische Nutzen der Antibiotika erheblich eingeschränkt wird, führt zu der Frage, ob außer der therapeutischen Anwendung auch der ständige Gebrauch der gleichen Antibiotika im Rahmen der Tierernährung die Ausbreitung unempfindlicher Erregertypen fördert (KNOTHE, 1967).

Die Angst um die menschliche Gesundheit bewirkte, daß sich der Gesetzesgeber mit dem Einsatz der Antibiotika (besonders der Tetracycline) im Tierfutter beschäftigte und sich dabei auf die Untersuchungen wissenschaftlicher Kommissionen stützte. Gegenwärtig liegen drei maßgebliche Berichte vor, die sich mit dem Problem befassen:

1. die dritte Mitteilung der Kommission zur Prüfung der Zusatzstoffe in Tierernährung und Tierhaltung der deutschen Forschungsgemeinschaft vom 15.8.1968,
2. der WHO - Report Nr. 430, der 1969 veröffentlicht wurde,
3. der im November 1969 in Großbritannien erschienene SWANN - REPORT.

So fordert die Deutsche Forschungsgemeinschaft, daß die Antibiotika, die zur Zeit in der Bundesrepublik als Zusatzstoffe für Tierfutter eingesetzt werden, folgende Kriterien erfüllen müssen:

1. möglichst geringfügige Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt,
2. keine chemischen Veränderungen des resorbierten Anteils im Tierkörper, die das Auffinden von Rückständen erschweren,

3. keine antigenen oder haptenen Eigenschaften, so daß Allergien ausgeschlossen werden können,
4. keine Verwendung für die Therapie beim Menschen oder beim Tier und keine Kreuzresistenz mit anderen Antibiotika, die in der Therapie eine Rolle spielen.

2.3. Resistenz gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden

Bakterielle Resistenz ist ein relativer, dosisabhängiger Begriff, über den nur in Beziehung zu einem antibakteriellen Wirkstoff Aussagen gemacht werden können. Parameter für diese Aussagen sind: Die Wirkungsintensität *in vitro*, d.h. die minimale Hemmkonzentration (MHK), sowie die Antibiotikakonzentration am Wirkort *in vivo*. Ist die minimale Hemmkonzentration eines Keimes *in vitro* höher als die höchste *in vivo* erreichbare Serum- oder Gewebeskonzentration, so ist der Keim resistent (WHO-Bericht 210, 1961; WALTER und HEILMEIER, 1969).

Das Resistenzverhalten von Mikroorganismen gegenüber Chemotherapeutika kann durch drei Resistenztypen charakterisiert werden (GILLESSEN, 1966; BRYSON u. SZYBALSKI, 1955; POTHMANN, 1955; SCHNITZLER u. GRUNBERG, 1957; GEISLER, 1964; WALTER u. HEILMEIER, 1969; ANDERSON, 1969 u. 1970, u.a.).

2.3.1. Angeborene, natürliche Spezies-oder Gattungsresistenz

Die angeborene natürliche Resistenz kann nach RIECK (1971) als Widerstandsfähigkeit gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen gekennzeichnet werden, die auf unspezifischem Weg einen antibakteriellen bzw. antiinfektiösen Schutz herbeiführen. Die Resistenz gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen wird aber nicht von allen Organismen in gleicher Weise realisiert. Sie ist im wesentlichen abhängig von der Spezies, der Rasse innerhalb der Spezies, der Familien innerhalb der Rassen, dem Individuum und der Resistenz bestimmter Organe des Individuums; außerdem sind Resistenzunterschiede zwischen den Altersgruppen (Jugend und Altersresistenz) und den Geschlechtern (Geschlechtsresistenz) zu erkennen (ROLLE u. MAYR, 1966; HUTT, 1970; RIECK, 1971, u.a.).

Die Grundlage der angeborenen Resistenz ist also das Genom des Individuums und nur der Genotyp, der die "richtige" Erbinformation besitzt, kann sich dem veränderten Milieu phänotypisch anpassen. So ist z.B. die ererbte relative Resistenz gegen die antimycotisch wirksamen Polyen-Antibiotika als Lücke im antibakteriellen Wirkungsspektrum eines Chemotherapeutikums erkennbar (WALTER u. HEILMEIER, 1969; RIECK, 1970, u.a.).

2.3.2. Erworbene, primäre oder sekundäre Resistenz

1. Spontane Änderungen im Genom

Sie basieren auf mutativen Veränderungen des Bakteriengenoms und sind auch im Falle der sekundären Resistenz ungerichtet, also keine Abwehrreaktionen der Mikroorganismen gegenüber den Chemotherapeutika; diese spielen lediglich die Rolle von Selektionsmechanismen (GILLESSON, 1966; BRYSON u. SZYBALSKI, 1955; DEMEREC, 1955 u. 1957; LEDERBERG et al. 1952; POTHMANN, 1955; SCHNITZLER, 1957; BRESCH, 1970, u.a.). Deshalb kann die primäre Resistenz durch das Auftreten resistenter Varianten in Populationen von Mikroorganismen charakterisiert werden, welche ohne vorherigen Kontakt mit einem Antibiotikum eine verringerte oder sogar fehlende Empfindlichkeit zeigen, normalerweise aber gegenüber einem Chemotherapeutikum empfindlich sind (BRYSON u. SZYBALSKI, 1955). Nachzuweisen ist die primäre Resistenz mit der Fluktuationsanalyse oder Replika-Technik (LEDERBERG, 1952). Die primäre Resistenz ist so lediglich das Endprodukt einer Mutationsentwicklung, während die sekundäre Resistenz, die erst durch den Kontakt mit einem Antibiotikum in einer empfindlichen Population entsteht, nach diesem Kontakt bei einigen Einzelorganismen der Population verringerte oder fehlende Sensibilität bewirkt. Deshalb ist es auch möglich, die sekundäre Resistenz in ihrer Entwicklung zu beobachten. Durch den Selektionsdruck einem Chemotherapeutikums überleben schließlich nur die resistenten Keime und ihre Nachkommen in einer Population. Beide Resistenztypen treten in der Größenordnung von $1:10^6$ bis $1:10^{13}$ Keimen, d.h. in der natürlichen Mutationsrate von Bakterienpopulationen auf (BRESCH, 1970). DEMEREC, 1955 u. 1957, leitet von der sekundären Resistenzentwicklung zwei Resistenz-Entwicklungstypen ab:

a) ONE-step-mutation oder Streptomycintyp der Resistenzsteigerung: nach einmaligem, meist aber zwei- bis viermaligem Kontakt mit dem Chemotherapeutikum treten Mutanten auf, die sehr hohe Resistenzgrade aufweisen.

Tabelle Nr. 3

Resistenztypen nach bakteriologischen und klinischen
Unterlagen

Angaben von DEMEREC (1955)

A. Multiple -step- mutation (Penicillintyp der Re- sistenzsteigerung)		B. One -step- mutation (Streptomycintyp der Re- sistenzsteigerung)	
1. Langsame Resistenzstei- gerung (bisher ohne prakt. Bedeutung)	2. Langsame Resist. steig.	3. Mäßige Resist. steig.	4. Rasche Resist. steig.
Amphotericin B	<u>Penicilline</u> Cephalosporine	<u>Tetracyclin-</u> <u>Gruppe</u>	Streptomycine Erythromycine
Ristocetin	b. gram-pos. Keimen	Cephalosporine	Oleandomycin
Vanomycin	Sulfonamide	b. gram-neg. K.	Novobiocin
Griseofulvin	<u>Chloramphenicol</u>	Kanamycin	Fusidinsäure
Nystatin	<u>Bacitracin</u>	Neomycin B	Lincomycin
Tyrothricin	<u>Polymixin B</u>	Gentamycin	Rifamycine
Trichomycin	Colistin	Paromomycin=	Spectinomycin
	Cycloserin	Aminosidin	Nalidixinsäure
	Thiosemicarbazone	Spiramycin	<u>Isoniazid</u>
		PAS	PAS (meist A3)
		Viomycin	Pyrazinamid
	Nitrofurane		Ethionamid

Die Höhe des Resistenzgrades ist aber nicht abhängig von der Konzentration des Chemotherapeutikums.

b) Multiple-step-Mutation oder Penicillintyp der Resistenzsteigerung. Die Resistenzentwicklung erfolgt langsam und stufenweise. Die Selektion resistenter Keime erfordert mehrere aufeinanderfolgende Schritte und ist von der jeweiligen Konzentration des Chemotherapeutikums abhängig.

2. Übertragbare Resistenz

Für das Phänomen der von Bakterien zu Bakterien übertragenen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika durch Übermittlung chromosomalen oder extrachromosomalen Materials sind im wesentlichen drei Mechanismen bekannt:

die Transformation, die Transduktion und die Konjugation.

Transformation bedeutet die Übertragung bestimmter Gene von einem Bakterienstamm auf einen anderen durch Aufnahme isolierter DNS (Desoxyribonukleinsäure) aus einem zellfreien Extrakt des Donators und nachfolgende erbliche Verankerung durch Rekombination (BRESCH, 1970). Die DNS kann nicht als intaktes Molekül, sondern nur in Fragmenten von der Akzeptorzelle aufgenommen werden, und daher wird meist nur eine Resistenzeigenschaft übertragen. Die Übertragungsfrequenz bei der Transformation ist jedoch sehr gering und beträgt unter optimalen Bedingungen, wenn sich die Empfängerzelle in kompetentem Zustand befindet, ca. 1% (LEBEK, 1969). Die Transformation ist neben den Pneumokokken nur noch bei Stämmen der Gattung Haemophilus influenzae, Bacillus subtilis, viridans-Streptokokken und Neisseria gonorrhoea bekannt (BRESCH, 1970)

Als Transduktion wird die Übertragung genetischer Information in Form von mehr oder weniger großen Genomteilen von einer Donor- auf eine Akzeptorzelle mittels temperierten Phagen (ZINDER u. LEDERBERG, 1952; HAYES, 1964) bezeichnet.

Temperierte Phagen unterscheiden sich von virulenten dadurch, daß die Injektion ihrer DNS in das Bakterium nicht unbedingt sofort zum Beginn der Synthese gleichartiger Phagenpartikel führt. Statt dessen wird die injizierte Phagen-

DNS in das Chromosom der bakteriellen Wirtszelle eingebaut und während einer mehr oder minder großen Zahl von Bakteriengenerationen vor jeder Zellteilung synchron mit dem Bakterienchromosom identische dupliziert. Ist es der Phagen-DNS aber möglich, sich von dem Bakterienchromosom zu lösen (spontane Induktion, UV-Bestrahlung oder Akridinbehandlung), so veranlaßt sie die Synthese gleichartiger Phagen, und die Lyse der Wirtszelle tritt ein. Im Verlauf dieser Phagensynthese können kleine Teile des Bakterienchromosoms in die einzelnen Phagen eingebaut und so bei einer erneuten Infektion weitergegeben werden (LEBEK, 1969). Meistens wird aber nur ein kleiner Teil (1-10) der Genomfragmente stabil in das Bakterium eingebaut; der Rest bleibt, ohne sich zu vermehren, in der Zelle liegen. Dieser Zustand wird als "abortive Transduktion" bezeichnet (ZINDER, 1953). BRESCH, 1970, versteht unter spezieller Transduktion die Übertragung nur bestimmter Gene (Gene aus der Galaktose-Region und das Gen für Biotin-Synthese) des Phagens, ohne daß eine Rekombination des Fragmentes mit dem Wirtschromosom eintritt.

Im allgemeinen wird durch die Transduktion mittels Phagen nur immer ein einzelnes Chromosomensegment mit etwa 20 bis 50 Genen in einer Häufigkeit von 10^{-5} übertragen (BRESCH, 1970), da die Gene für die einzelnen Antibiotikaresistenzen in der Regel im Bakterienchromosom nicht hintereinanderliegend lokalisiert sind. Durch Transduktion kann deshalb immer nur eine chromosomal gesteuerte Resistenzeigenschaft übertragen werden (JINKS, 1967; LEBEK, 1969; STAHL, 1969; SWANSON et al., 1970).

Die dritte Übertragungsart ist die Konjugation, die chromosomaler Natur oder episomal als sogenannte infektiöse Resistenz vorkommen kann (HAYES, 1964; JACOB u. WOLLMAN, 1961; LEBEK, 1969; SHERISHORINA, 1970; BRESCH, 1970 u.a.). ISEKI (ref. von WATANABE, 1963) prägte den Begriff R-Faktor für die Resistenzfaktoren, die durch Konjugation von Zelle zu Zelle weitergegeben werden können. WATANABE et al. übernahmen diese Bezeichnung, verstanden darunter jedoch ein genetisches Element, das unabhängig von seiner Übertragbarkeit

durch Konjugation aus RTF (resistance transfer factor, WATANABE u. FUKASAWA, 1960) und Resistenzdeterminanten besteht und wegen des RTF-Anteils episomalen Charakter besitzt (MITSUHASHI, 1965 u.a.).

Episome, wie z.B. der F-Faktor (Fertilitätsfaktor, WATANABE et al., 1960), durch den alle drei Übertragungsarten verursacht werden können (ADELBERG u. PITTARD, 1960; CLOWES, 1962; FREDERICQ, 1964; HAYES, 1964; BRANDIS, 1964; JACOB u. WOLLMAN, 1961; CLARK u. ADELBERG, 1962; SNEATH, 1962; BRESCH, 1970; SWANSON, 1970, u.a.), sind genetische Elemente, die alternierend entweder autonom im Cytoplasma oder an das Wirtschromosom integriert vorkommen. Sie können mit benachbarten chromosomalen Regionen genetische Rekombinationen eingehen, dadurch chromosomale Strukturen inkorporieren und diesen so episomalen Charakter verleihen (HAYES, 1964, u.a.). Beide Erscheinungsarten (frei im Cytoplasma und integriert an das Wirtschromosom) unterscheiden sich in ihrer Funktion und schließen sich gegenseitig aus (LEBEK, 1969; FALKOW, 1969, u.a.). Episome sind für Bakterien nicht absolut notwendig, da sie entbehrliche Eigenschaften kontrollieren (BRESCH, 1970). Ein dem Episom verwandtes extrachromosomales Element ist nach BRANDIS u. SMARDA, 1970, u.a. das Plasmid, das sich als cytoplasmatischer genetischer Faktor autonom, vom Chromosom, unabhängig reproduziert, und in der Übermittlung der Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken eine wesentliche Rolle spielt (NOVICK, 1969, u.a.). In letzter Zeit (LEBEK, 1969; BRANDIS u. SMARDA, 1971) werden diese beiden cytoplasmatischen Elemente nicht mehr so streng getrennt.

Bakterien, die R-Faktoren enthalten, benehmen sich laut DATTA, 1971, als ob sie zwei Chromosome hätten. So erhält bei einer R-Infektion (Übertragung von R-Faktoren durch Zellkontakt, MITSUHASHI et al., 1962) nicht ein Bakterienklon einer Population als erstes die Resistenz, sondern die ganze Kultur wird fast gleichzeitig mit der R-Faktor determinierten Resistenz infiziert. Die Weitergabe der Antibiotikaresistenz und ihre Stabilität ist in der Bakterienzelle durch das Zusammenwirken von R^+ - und F-Faktoren ge-

kennzeichnet (KONDO, 1962; WATANABE et al. 1966 u. 1970; FALKOW et al. 1966; BRESCH, 1970; DATTA, 1971).

Die Übertragung selbst erfolgt bei der Konjugation in Form des Plasmaaustausches; der Ablauf ist aber noch nicht vollständig bekannt (DATTA, 1971). LEBEK, 1969, gliedert den Übertragungsmechanismus in drei Phasen und veranschaulicht die möglicherweise ablaufende genetischen Vorgänge wie folgt:

1. Konjugation (Paarung)

Der die Wirtszelle zum Donator befähigende F-Faktor kann in zwei Variationen vorkommen. Der eine Zustand F^+ (männliche Zelle), der den Fertilitätsfaktor (F) enthält (HARADA, 1964), bewirkt die Übermittlung des extrachromosomalen Genmaterials und die F-Infektion auf eine F^- (weibliche) Zelle. Die Weitergabe erfolgt in diesem Fall immer einseitig von F^+ -Zellen auf F^- -Zellen (AIKIBA et al., 1961; MORRISON, 1970 u.a.); dabei wird aber kein Chromosomenmaterial ausgetauscht.

Liegt der Fertilitätsfaktor jedoch ringförmig im Bakterienchromosom und nicht extrachromosomal, so nimmt der F-Faktor bei der Übertragung Chromosomenstücke mit in die F^- -Zelle (ADELBERG u. PITTARD, 1965 u.a.). Diese infizierten Zellen haben dann eine besonders hohe Konjugationsfrequenz (NISIOKA, 1970 u.a.), und man bezeichnet sie als Hfr (High frequency of recombination)-Zellen (WATANABE, 1960).

Die Konjugation erfolgt mit Hilfe des auf der Donator-Oberfläche durch den F-Faktor determinierten Sexual-Pilus (BRINTON, 1964 u.a.). Größenmäßig liegen die Sexualpili zwischen den bekannten Bakterienfortsätzen fimbriae und flagellae (DATTA, 1971). Während DATTA, 1971, die Auffassung vertritt, daß der Pilus lediglich den Kontakt zur angrenzenden Zelle herstellt, die Konjugation selbst jedoch durch direkte Anlagerung der Zellen abläuft, behauptet BRINTON, 1964, daß der Pilus eine "röhrenförmige" Verbindung zwischen den Partnerzellen bildet, durch die bei der F-Infektion der autonome F-Faktor, der bei F-Kreuzung das Donator-Chromosom oder Teile davon in die Akzeptorzelle eindringen (JACOB u. WOLLMAN; 1961).

2. a) Weitergabe des im Donator extrachromosomal lokalisierten genetischen Elementes F bzw. F' (F-Infektion) oder

b) Übertragung eines Chromosomenfragmentes (F-Kreuzung) durch einen chromosomal integrierten F-Faktor in die Akzeptorzelle.

Zu 2. a) Paart eine den F-Faktor im extrachromosomalen Zustand enthaltende F⁺-Zelle sich mit einer F⁻-Zelle, die das F-Episom nicht besitzt, so wird Letzteres in die F⁻-Zelle verlagert (F-Infektion), wodurch diese zu einer potentiellen Donatorzelle wird. Enthält der F-Faktor Genes eines früheren Wirtes, die er im Hfr - Zustand vom Chromosom aufgenommen hat, wodurch er zum F'-Faktor, z.B. F'-lac (lac bedeutet den Gehalt des die Spaltung von Laktose kontrollierenden Genkomplexes, ZEUTHEN u. PATO, 1971), geworden ist, so überimpft er sie durch seinen Übertritt an die Akzeptorzelle. Diese erwirbt dadurch die entsprechenden Eigenschaften.

Zu 2. b) Im Hfr - Status heftet sich das F - Episom an einen mit eigenen Strukturen homologen Ort des Chromosoms an, und die Paarung mit einer Akzeptorzelle leitet den Transfer des Donator - Chromosoms ein. Hierzu bricht die Ringstruktur an der Anheftungsstelle des F-Faktors auf, und das Donatorchromosom gleitet mit dem F-Faktor am Ende innerhalb des Sexualpilus in die Akzeptorzelle über (F - Kreuzung), welche mit dem genetischen Material im allgemeinen nicht auch das F - Episom erwirbt, da der Übertragungsprozess in den meisten Fällen beendet wird, bevor das ganze Chromosom weitergegeben ist. Häufig bricht das Chromosom auch bereits kurz nach Beginn der Konjugation auseinander, so daß nur ein kleines Segment mit wenigen Genen in die Akzeptorzelle gelangt. R-Faktoren werden in hoher Frequenz dann übertragen, wenn die Donatorkeime sie gerade erhalten haben. Die Folge des als HFRT bezeichneten Systems (WATANABE, 1963) ist die nach der Übertragung für etwa fünf Generationen ausbleibende Aktivität eines vom R - Faktor selbst getragenen Repressors, der die Ausbildung der Sexualpili unterdrückt, welche beim Konjugationsvorgang eine Hauptrolle spielen. Mit dem Aktivitätsbeginn des Repressors endet das HFRT System.

3. Nach der F-Kreuzung tritt eine Rekombination zwischen dem übermittelten Chromosomenfragment und homologen Strukturen des Akzeptochromosoms ein. Hierdurch werden die weitergegebenen Eigenschaften genetisch fixiert, bzw. nicht rekombinierte Fremdgene verschwinden mit der Zeit durch Ausverdünnen aus der Population.

Zwischen R-Faktoren und anderen Episomen bzw. Plasmiden bestehen Wechselwirkungen (GINOZA u. PAINTER, 1964; BEALE, 1969; BRANDIS u. SMARDA, 1971; BURMANN et al., 1968; CHABBERT et al., 1969; CLOWES et al., 1968 u. 1969; DATTA, 1965 u. 1971; HAMON u. CHABBERT, 1970; HARADA et al., 1961 u. 1964; HAYES, 1969; JACOB u. WOLLMAN, 1965; KHATOON u. LYER, 1971; KROMERY u. JANOUSKOVA, 1969; KONDO u. MITSUHASHI, 1962; MEYNELL u. DATTA, 1966 u. 1968; MORRISON u. MALAMY, 1970; NOVAKOVA et al., 1970; REEVE, 1966; WATANABE, 1962 u. 1966; ZEUTHEN u. PATO, 1971; HASHIMOTO et al., 1961, u.a.). Einige R-Faktoren (fi^+ = fertility inhibition) sind in der Lage die Funktion des F-Faktors auf 1% (DATTA, 1971) zu reduzieren, andere dagegen nicht (fi^-). Der R-Faktor (fi^+) ist mit (fi^-) rekombinationsfähig, dagegen (fi^-) nicht mit (fi^+). Durch die Hemmwirkung von (fi^+) und zwischen zwei (fi^-)-R-Faktoren kommen Phänomene vor, die als Superinfektions-Immunität mit gegenseitigem Ausschluß bezeichnet werden. (UNOWSKY u. RACHMELER, 1966; CLOWES et al., 1968). LEBEK, 1969, versteht darunter, daß die Übertragung durch die Gegenwart homologer oder heterologer genetischer Elemente gehemmt bzw. das superinfizierende Element aus der Wirtszelle eliminiert wird. Der Mechanismus der Superinfektiosität hängt mit z.T. biochemischen Veränderungen der Zelloberfläche von Wirtskeimen zusammen (GEISLER, 1964; NOVICK, 1969, u.a.). Für die Sulfonamid-Resistenz wird eine spezifische Permeabilitätsverminderung der Bakterienzelle verantwortlich gemacht (NOVICK, 1969; SWANSON et al., 1970; BRESCH, 1970, u.a.). SEVAG u. YOKOTA, 1960, stellten bei in vitro isolierten sulfonamidresistenten Colibakterien eine Anhäufung von bestimmten Intermediärprodukten wie Pteridin, Folsäure und Tetrahydrofolsäure fest, die die Sulfonamidwirkung aufheben können; andere Autoren konnten diese Stoffwechselveränderungen jedoch nicht be-

stätigen (LEBEK, 1969). Die biochemische Grundlage für die anderen R-gesteuerten Resistenzeigenschaften ist die Produktion spezifischer Enzyme, die die betreffenden Antibiotika inaktivieren (ACHTMANN et al., 1971; ANDERSON, 1967; BENHAMIDA, 1971; BENVENISTER u. DAVIS, 1971; KLASTERSKY et al., 1971; SCHNEIDERSON, 1970; KRCMERY, 1969, u.a.). Durch die Konjugation können R-Faktor determinierte Mehrfachresistenzen gegenüber Streptomycin (EGAWA, 1964), Penicillin (LEDUC, 1966; BOBOWSKI, 1970), Chloramphenicol (REEVE, 1966), Tetracyclinen (FRANKLIN, 1965 u. 1967, u.a.), Sulfonamiden (BAUER, 1964), Ampicillin, Neomycin, Kanamycin (LEBEK, 1969) und anderen Antibiotika vor allem bei der Gattung Enterobacteriaceae Verbreitung finden (LEDERBERG, 1952; JACOB u. WOLLMAN, 1961 u. 1965; ADELBURG u. PITTARD, 1965; HAYES, 1964 u. 1969; SWANSON, 1970; ANDERSON, 1967; GIAMMANCO, 1968 u. 1971; NORDSTRÖM, 1971, u.a.). Die Übertragung antibiotischer Mehrfachresistenzen mittels Konjugation ist bisher nur bei gram-negativen Bakterien bekannt (CHABBERT u. Le MINOR, 1966; GUINEE, 1968; NOVICK, 1969; NATOLI, 1969; LEBEK, 1969; BRESCH, 1970; DATTA, 1971, u.a.). Sie kann bei Stämmen von Shigellen (ANZAI u. NAKAMURA, 1968), Salmonellen (DATTA, 1962; VOOGD et al., 1970; ANDERSON, 1969; JAROLMEN, 1969; WATANABE u. OGATA, 1970), Escherichia coli (WATANABE et al., 1960, 1962, 1963, 1964, 1966; DATTA, 1962; MITSUHASHI, 1964; ENNIS, 1971, u.a.), Pasteurellen, Citrobacter, Acidobacter (DOBOZY u. HAMMER, 1969), Pseudomonas (FULLBROOK et al., 1970; SYKES u. RICHMOND, 1970), Proteus und Klebsiellen entweder innerhalb einer Spezies oder auch zwischen den Spezies erfolgen (MITSUHASHI, 1960; FALKOW et al., 1962; ROE et al., 1971; WIEDEMANN et al., 1969; KAPPELMACHER et al., 1964 u. 1969, u.a.).

Tabelle Nr. 4

Übersichtstabelle der verschiedenen episomalen Faktoren
nach NOVICK, 1969

Phänotyp	Wirkungsweise	Übertragen von
übertragbare Resistenz mittels Konjugation	verbundener Komplex	Sex-Faktoren
Oberflächenausschluß	Antigen?	Sex-Faktoren
spezifisch-männliche Phagenempfindlichkeit	Sex-pili	Sex-Faktoren
Colicinogenie	unbekannt	Col-Faktoren, R(i)-Faktor
Colicin-Resistenz	unbekannt	Col-Faktoren, R(i)-Faktor
Phagen-Resistenz	unbekannt	F
Einschränkung der Phagen- Aktivität	Nuklease	P1, R(i) Faktoren, oder I-ähnliche Sex-Faktoren
Phagenveränderung	unbekannt	P1, R(i) Faktoren, oder I-ähnliche Sex-Faktoren
UV-Resistenz	unbekannt	Col I, Col B, R(i), R(f)
Arsenat-Resistenz	unbekannt	P-Plasmide
Bismut-Resistenz oder epistatische Empfind- lichkeit von (Bi ⁺⁺⁺)	unbekannt	P-Plasmide
Hauptsächliche Resistenz von (Pb ⁺⁺⁺)	unbekannt	P-Plasmide
Cadmium-Resistenz (Cd ⁺⁺)	unbekannt	P-Plasmide
Quecksilber-Resistenz (Hg ⁺⁺)	unbekannt	P-Plasmide
Kobalt-Resistenz (Co ⁺⁺)	unbekannt	R-Faktoren
Nickel-Resistenz (Ni ⁺⁺)	unbekannt	R-Faktoren
Silikat-Empfindlichkeit	unbekannt	P-Plasmide
Dodecyl-Sulfat Empfind- lichkeit	unbekannt	F, R-Faktoren
Akridin-Empfindlichkeit	unbekannt	P-lac, R(f)
Kontrolle der Penicilli- nase-Bildung	unbekannt	P-Plasmide
Penicillin-Resistenz	unbekannt	P-Plasmide, R-Faktoren
Erythromycin-Resistenz	unbekannt	P-Plasmide
Chloramphenicol-Resistenz	Acetylase (+AcCoA)	R-Faktoren
Streptomycinresistenz	Adenylase (+ATP)	R-Faktoren
Streptomycinresistenz	Phosphorylase (+AtP)	R-Faktoren
Kanamycin-Resistenz	Acetylase (+AcCoA)	R-Faktoren
Kanamycin-Resistenz	Phosphorylase (+ATP)	R-Faktoren
Neomycin-Resistenz	Phosphorylase	R-Faktoren
Sulfonamid-Resistenz	unbekannt	R-Faktoren
Tetracyclinresistenz	unbekannt	R-Faktoren
Alpha-haemolysin-Produkt.		Hly-Faktor
Enterotoxin-Produktion		Ent-Faktor
K 88 Oberflächenantigen- Produktion		K 88 - Faktor

2.4. Colicine

Im Jahre 1925 beschrieb GRATIA einen Sonderfall von Antagonismus zwischen zwei *Escherichia coli*-Stämmen; das Filtrat der Bouillonkultur des einen Stammes, den er als "E.coli-V" (virulent) bezeichnete, hemmte wesentlich die Vermehrung des anderen Stammes der gleichen Art, der als sensibel gegenüber bestimmten Bakteriophagen bekannt war. Er erkannte, daß nicht die Bakteriophagen, sondern eine andere antibiotische Substanz diese Hemmung verursacht hatte. Spätere Untersuchungen von FREDERICQ (1946 u. 1948) ergaben, daß diese antibiotischen Substanzen unter *Escherichia coli*-Stämmen keine Seltenheit sind, und GRATIA u. FREDERICQ (1946) bezeichneten diese Stoffe als "Colicine".

Ursprünglich bezog sich also die Bezeichnung "Colicin" auf spezifische antibiotische Stoffe, die von *Escherichia coli*-Stämmen produziert werden und im gewissen Sinn "Kampfstoffe" der Gattung gegenüber anderen Spezies darstellen.

Nach Bekanntwerden weiterer den Colicinen analogen Substanzen schlugen JACOB, LWOFF, SIMINOVITCH u. WOLLMAN auf dem Budapester Symposium 1966 für diese antibiotischen Substanzen die allgemeine Bezeichnung Bacteriocine vor und definierten den Begriff folgendermaßen: "Das Bacteriocin ist ein Antibiotikum von Eiweißcharakter, dessen Produktion letal ist und dessen Wirkung, begrenzt auf einen engen Komplex verwandter Arten, durch Gegenwart spezifischer Rezeptoren bedingt ist."

Die Colicine lassen sich also am einfachsten als Bacteriocine von *Escherichia coli* definieren (BRANDIS u. ŠMARDÁ, 1971). Durch weitere Untersuchungen traten jedoch Abweichungen zu der Definition auf, so daß ŠMARDÁ (1971) folgende Definition heute für geeigneter hält: "Colicine sind spezifische antibiotische, im Laufe des Wachstums bestimmter Kulturen von Enterobacteriaceae, insbesondere *Escherichia coli*, gebildete Stoffe, deren wirksamer Bestandteil Protein-(Polypeptid-) Charakter hat, die ein spezifisches Stamm-

wirkungsspektrum aufweisen, begrenzt auf andere Stämme der eigenen Art und eventuell nahe verwandter Arten, immer jedoch auf *Escherichia coli* wirksam sind, und die zu ihrer Wirkung einen spezifischen Rezeptor in der zytoplasmatischen Membran der sensiblen Zellen benötigen."

Die Fähigkeit einer Bakterienzelle, Colicin eines bestimmten Typs zu synthetisieren, erhält die Zelle über den colicinogenen Faktor (col-Faktor oder C-Faktor) (BRANDIS und ŠMARDÁ, 1971). Die col-Faktoren sind kleine DNS-Ringe, auf denen sich Gene befinden, die in der Lage sind, einen Sexualpilus zu bilden, mit dessen Hilfe sie in eine andere Zelle gelangen können (FREDERICQ, 1969). Der col-Faktor hat Plasmid-Charakter, da er in der Regel nicht an das Bakterienchromosom gebunden ist; manche col-Faktoren werden jedoch unter die Episome eingereiht wie col I, col B, col V-K30 und col V-K94, da sie auch an das Bakterienchromosom gebunden vorkommen können.

Der Transfer des colicinogenen Faktors in die Bakterienzelle durch Konjugation oder Transduktion bedeutet, daß die Zelle immer gleichzeitig die vererbte potentielle Fähigkeit zur Synthese des Colicins und die Immunität ihm gegenüber erlangt. Sofern der colicinogene Faktor im latenten Zustand verbleibt, erfolgt keine letale Biosynthese des Colicins, seine Anwesenheit äußert sich im Gegenteil darin, daß es der Zelle Immunität gegenüber dem entsprechenden Colicin gewährt. Wenn der Donator und der Rezipient verschiedene Colicine erzeugen, bilden alle Rekombinanten Colicin des Erzeugers F^- ; einige von ihnen erlangen auch den col-Faktor des Erzeugers F^+ und sind danach zweifach colicinogen. Ähnlich können sie durch weitere Konjugationen schrittweise die Fähigkeit erlangen, mehrere Typen von Colicinen zu produzieren (BRANDIS u. ŠMARDÁ, 1971; HOLLAND, 1967). Aber erst durch eine spontan eintretende Induktion wird die Bakterienzelle dazu veranlaßt, Colicin zu produzieren, das meistens zu einer Massenproduktion führt und damit auch zum Tode der produzierenden Zelle. Eine Zelle der Population "opfert sich" also und tötet für die anderen alle nicht zum Klon gehörigen Colizellen ab, was in Gegenwart anderer

Colizellen ein Selektionsvorteil darstellt, da der Träger eines colicinogenen Faktors selbst immun gegen das von ihm produzierte Protein ist (BRESCH, 1970).

Das Colicin wird stets nur von einem kleinen Teil der Population der colicinogenen Kulturen gebildet, in dieser bewahrt sich allerdings jede Zelle die vererbare Fähigkeit, Colicin zu produzieren (BRANDIS u. SMARDA, 1971).

Die Colicinogenie ist also eine konstante Eigenschaft der Bakterien des Produktionsstammes, und so bildet der Stamm CA 7 (E.coli "V"), an dem GRATIA, wie oben beschrieben, das Phänomen der Colicinproduktion entdeckt hatte, noch heute das gleiche Colicin V wie im Jahre 1925.

Es kann aber auch zu einem Verlust dieser Eigenschaft im Verlauf von Passagierungen der Stämme kommen (FREDERICQ, 1948 u.a.); außerdem wurde auch vereinzelt das Auftreten nicht colicinogener Mutanten beobachtet (HAUDUROY u. PAPAVALASSILIOU, 1962).

Es sind eine Vielzahl von Typen der Colicine bekannt;

ŠMARDA (1971) gibt 23 unterschiedliche Typen, wie z.B.

Colicin A, -B, -C, -D, -E1, -G, -M, -S1, -V, u.a., an und stellt folgende Theorie ihres Wirkungsmechanismus auf:

1. Jedes Colicin wirkt nur auf bestimmte Stämme. Der gleiche Stamm kann aber gleichzeitig gegenüber mehreren Colicinen sensibel sein.
2. Die bakteriostatische Wirkung der Colicine nach dem Kontakt ist augenblicklich, sie ist aber eine bestimmte Zeit lang durch Trypsin oder ein anti-Colicin-Serum reversibel. Die Adsorption selbst ist jedoch offenbar irreversibel.
3. Die Colicine dringen also nicht in die Zelle ein, sondern verfangen sich irgendwo auf ihrer Oberfläche und wirken von dort aus.
4. An die gleiche Stelle der Bakterienoberfläche (sog. Rezeptor) können Colicine mit verschiedener Wirkung gebunden werden, während unterschiedliche Colicine, die sich an verschiedene Rezeptoren binden, im wesentlichen die gleiche Primärwirkung auf die Zelle haben können.

5. Zur Adsorption des Colicins ist keine Energiezufuhr von seiten der Zelle erforderlich, sie ist aber notwendig zur Entwicklung seines biochemischen Effektes.
6. Die Sensibilität der Sphäroplasten und der stabilen L-Form der sensiblen Zellen gegenüber Colicinen gleicht der der normalen Stäbchen desselben Stammes, oder sie ist höher (ausnahmsweise niedriger).
7. Die letale Wirkung der meisten Colicine verläuft nach der Eintrefferkurve.
8. Die Rate und der Grad der Wirkung der Colicine sind eine Funktion der "Multiplizität" der Letaleinheit auf die Zelle.
9. Der eigene Primäreffekt der verschiedenen Colicine auf die Biochemie der Zelle ist verschieden.
10. Das Colicin E2 bewirkt in den Zellen die Degradation der DNS, bei direkter Berührung mit DNS in vitro hat es jedoch keine DNase analoge Wirkung.
11. Colicinogene Bakterien, die gegenüber dem homologen Colicin immun sind, adsorbieren es trotzdem, während die gegenüber bestimmten Colicinen resistenten Bakterien es nicht adsorbieren. Es gibt aber auch refraktäre Mutanten, die der Wirkung eines bestimmten Colicins nicht unterliegen, obwohl sie es adsorbieren und den entsprechenden col-Faktor nicht enthalten.;

Vorwiegend wurde das Auftreten der Colicinbildung bei Stämmen von *Escherichia coli* bearbeitet (GRATIA u. FREDERICQ, 1946; HALBERT, 1948; GARDENER, 1950; LUDFORD u. LEDERER, 1953; PAPA VASSILIOU, 1960; LICHODÉD u. KUDLAJ, 1963; HAMON u. PÉRON, 1965; HOLLAND, 1967; CLOWES, 1961 u. 1963, u.a.). Für diese Gattung wird von BRANDIS u. ŠMARDÁ (1971) ein Vorkommen der Colicinogenie mit 20-25% angenommen. Aber nicht nur die Gattung *Escherichia coli* bildet Colicine, sondern man fand bei fast allen gramnegativen und selbst auch bei grampositiven Spezies die Fähigkeit, Bacteriocine bzw. bacteriocinähnliche Substanzen zu bilden, wie folgende Tabelle veranschaulicht.

Tabelle Nr. 5

Übersicht über Bakterienarten, bei denen Bacteriocine bzw.
bacteriocinähnliche Substanzen vorkommen
(nach BRANDIS, 1971)

gramnegative Bakterien

Familie	Art	Bezeichnung der antibiotischen Substanz
Pseudomonadaceae	Pseudomonas aeruginosa	Pyocin
	Ps. fluorescens	Fluocin
	Ps. phytopathogenes	
	Xanthomonas spp.	
Spirillaceae	Vibrio cholerae	Vibriocin
Rhizobiaceae	Argobacterium tumefaciens	
Achromobacteriaceae	Achromobacter spp.	
	Alcaligenes faecalis	
Enterobacteriaceae	Escherichia coli	
	Citrobacter freundii	Colicin
	Shigella spp.	
	Salmonella spp. (einschl. Arizona)	
	Klebsiella pneumoniae	
	Enterobacter (Aerobacter) aerogenes	Aerocin
	cloacae	
	Hafnia alvei	
	Serratia marcescens	Marcescin
	Proteus mirabilis	
	Proteus morgani	
	Proteus vulgaris	
	Erwinia carotovora	
Parvobacteriaceae (Brucellaceae)	Pasteurella pestis	Pesticin
	P. pseudotuberculosis	
	Pasteurella multocida	
	P. tularensis	
	Brucella spp.	
	Bordetella pertussis	
Bacteroidaceae	Bacterioides spp.	
Myxococcaceae	Chondrococcus columnaris	
Neisseriaceae	Neisseria meningitidis	

zu Tabelle Nr. 5

grampositive Bakterien

Familie	Art	Bezeichnung der antibiotischen Substanz
Micrococcaceae	Staphylococcus aureus	Staphylococcin
	Staphylococcus albus	
	Micrococcus spp.	
Lactobacillaceae	Streptococcus pyogenes	Enterocin
	Diplococcus pneumoniae	
	Str. viridans	
	Str. faecalis	
	Str. faecium	
	Str. lactis	
	Lactobacillus spp.	Monocin
Corynebacteriaceae	Listeria monocytogenes	
	Corynebacterium diphtheriae	
Bacillaceae	Bacillus megaterium	Megacin
	B. cereus	Cerescin
	B. subtilis	Welchicin
	Chlostridium perfringens	
	Cl. botulinum	
	Cl. sporogenes	Boticin
Mycobacteriaceae	Mycobacterium tuberculosis	
Streptomycetaceae	Streptomyces virginiae	

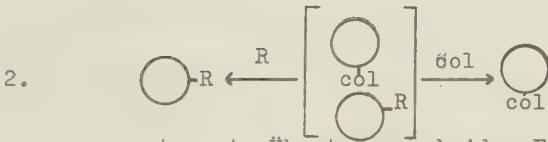
Beziehungen zwischen Colicin-Faktoren und der R-Faktor determinierten Mehrfachresistenz konnten ANDERSON u. LEWIS, 1955 nachweisen; sie stellten fest, daß der Colicin-faktor col E2 mit dem Resistenzfaktor gegenüber Tetracyclin und Ampicillin im Zusammenhang steht und col I häufig mit der Resistenz gegenüber Streptomycin assoziiert ist. Bei *Escherichia coli*-Stämmen wurde ferner eine Immunität gegen Superinfektionen zwischen bestimmten fi^+ R-Faktoren und col B nachgewiesen (CLOWES et al. 1968; FREYDMAN u. MEYNELL, 1969). Der R-Faktor verhindert gleichfalls die Übertragung von col V durch Konjugation, wenn beide in demselben Donor vorhanden sind (KUDLAY u. BALANIN, 1968). Die Ähnlichkeit zwischen den fi^- R-Faktoren und col I-Faktoren ist so groß, daß jeder dritte fi^- R-Faktor zugleich die Bildung von Colicin I bewirkt (MEYNELL, 1969). KRČMĚRY u. JANOUSKOVÁ, 1969, berichteten von einer Mobilisierung der RT-Determinanten (Resistenz gegenüber Tetracyclin) durch einen nicht definierten col-Faktor. Der col-Faktor soll nach KRČMĚRY, 1971, sogar oft enger an den R-Faktor gekoppelt sein als an den Fertilitätsfaktor. Er gab drei Möglichkeiten einer gemeinsamen Übertragung von R-Faktor und Colicin-Faktor an, wie es in der Abb. 1 veranschaulicht wird.

Abb. 1:

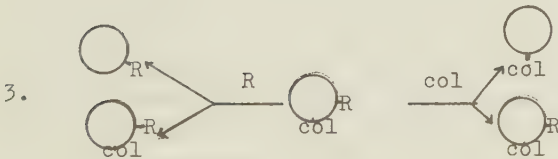
Mögliche gemeinsame Übertragung von Resistenz- und Colicin-Faktoren
nach KRČMĚRY, 1971



gemeinsame Übertragung beider Faktoren



getrennte Übertragung beider Faktoren



Kombination zwischen 1. und 2.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Anzüchtung und Isolierung von Enterobacteriaceae aus Futtermitteln

207 Handelsfuttermittel wurden auf das Vorkommen von Enterobacteriaceae untersucht. Das Untersuchungsmaterial stammte aus der Zeit vom August 1968 bis August 1971 und setzte sich folgendermaßen zusammen:

163 Handelsfuttermittel waren mit dem Verdacht auf Infektionserreger in das Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München eingeschickt worden.

44 Handelsfuttermittel wurden eigenhändig unter Verwendung steriler Geräte an drei tierärztlichen Instituten der Universität München im Juli 1971 gezogen.

Außerdem wurden 110 dieser Futtermittel speziell auf das Vorkommen von Salmonellen überprüft.

Eine Übersicht der verwendeten Handelsfuttermittel gibt die Tab. Nr.6 an.

Von jedem Handelsfuttermittel wurden an drei verschiedenen Stellen Einzelproben von jeweils fünf Gramm mit sterilen Geräten entnommen und in einen 200 ml Erlenmeyerkolben verbracht, der mit frisch zubereiteter erkalteter Enterobacteriaceae-Anreicherungsbouillon (E.E.-Broth, Oxoid-London, Code CM 317) angefüllt war. Das Verhältnis der abgewogenen Einzelprobe zum Anreicherungsmedium entsprach 1:25 entsprechend der Oxoid-Information Nr.D/29. Nach Beschickung der Kolben wurden die Proben zum Suspendieren je dreimal 30 Sekunden, abwechselnd mit und gegen den Uhrzeigersinn geschüttelt, danach 18 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Der bebrüteten Bouillon wurde eine Öse Flüssigkeit (0,01ml) entnommen und jeweils eine Platte Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (Oxoid, London Code CM 107) und eine Platte Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar, dem auf einem Liter Ansatzbouillon zusätzlich 10,0 g Glucose hinzugegeben worden war, beschickt und das Material mit einem sterilen Drigalski-Glasspatel auf der Nährbodenoberfläche gleichmäßig verteilt. Die Beurteilung der auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien erfolgte nach 18- bis 24stündiger Bebrütung bei 37°C.

Tabelle Nr.6

Übersicht der verwendeten Handelsfuttermittel, die zur Isolierung von Enterobacteriaceae und Salmonella dienten

Art der Futtermittel	auf Enterobact.überprüft		
	eingesandte Proben	selbst entnommen	auf Salmonellen überprüft
<u>Mischfutter:</u>			
Schw., Gefl., Rd.	28	7	18
Milchaustauscher	14	4	6
Eiweißkonzentrat	2	-	2
Mineralstoffmischung	9	-	8
Preßfutter	45	26	43
<u>Einzelfuttermittel:</u>			
Getreide:	25	7	15
Mais, Hafer, Weizen, Gerste, Stroh u. Heu			
Kleien, Mehle, Schrote	26	-	16
Hafercreme	10	-	-
Silage	4	-	2
	163	44	110

Die Anzüchtung der Salmonellen erfolgte nach der gleichen Methode; nur das Anreicherungsmedium und der Selektivagar wurden in Anlehnung an MOSSEL u. VINCENTI (1968) verändert. Als Anreicherungsbouillon diente die modifizierte MÜLLER - KAUFMANN-Tetrathionat-Bouillon (Oxoid, London, Code CM 343), die sich aus 7,0g Trypton, 2,3g Soja Pepton, 2,3g Kochsalz, 25,0g Kalziumkarbonat, 40,7g Natriumsulfat und 4,75g Fleischbrühe zusammensetzte. Davon wurden 82g in einem Liter destilliertem Wasser zum Kochen gebracht, sodann unter 45°C abgekühlt und 19ml einer Jod-Suspension (20g kristallines Jod und 25g Kaliumjodat auf 100 ml destilliertes Wasser) sowie 9,5ml einer 0,1%igen Brillantgrün-Suspension frisch zugesetzt, gut geschüttelt und je 50ml in 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben abgefüllt. Als Differenzierungsagar wurde der modifizierte Brillantgrün-Agar (Oxoid, London, Code CM 329) verwendet.

Die isolierten Kolonien wurden auf einen Konservierungsagar (nach mündl. Angaben von GEDEK, W., 1971) überimpft, der folgendermaßen hergestellt wurde: 500ml Aqua dest., 5g NaCl, 10g Pepton aus Fleisch (tryptisch, Merck-Darmstadt) und 10g Liebig-Fleischextrakt (Fa. Brunnengräber, Lübeck) wurden erhitzt, bis sich alle Bestandteile gelöst hatten, kurz aufgekocht und dann zum Erkalten gebracht. Nachdem der pH-Wert auf 8,0 eingestellt worden war, wurde diese Bouillon solange gekocht, bis sie gut ausflockte, dann filtriert (Faltenfilter) und mit eingeweichtem Kobe-I-Agar 30 Minuten autoklaviert. Die autoklavierte Bouillon mit Kobe-I-Agar wurde dann mit Watte filtriert und davon je 4,2ml in Reagenzgläser abgefüllt, die nochmals für 10 Minuten in den Autoklaven gestellt, dann zum Erkalten in Schräglage gebracht und anschließend mit einem in Paraffin getauchten Korken verschlossen wurden.

3.2. Differenzierung der isolierten Enterobacteriaceae

196 isolierte und als coliforme Keime vermutete Bakterienstämme wurden weiteren differentialdiagnostischen Bestimmungsverfahren unterzogen. 170 dieser Bakterienstämme stammten aus eingesandten und 26 Stämme aus selbst gezogenen Futtermittelpuben.

Außerdem wurden 28 Bakterienstämme gleicher Herkunft, die der Gattung Salmonella anzugehören schienen, weiter differenziert.

Von dem Konservierungsagar wurde wenig Material mit der sterilen Öse entnommen und auf jeweils eine Blutagarplatte ohne Blutzusatz (Oxoid, London, Code CM 55), =Normalagar, und eine Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agarplatte nach Gassner (Merck, Darmstadt, Art. 1282) so überimpft, daß nach 18- bis 24stündiger Bebrütung Einzelkolonien beurteilt werden konnten.

Nach der Gram-Färbung erfolgten die weiteren biochemischen Tests nur mit laktosepositiven Kolonien ausgehend von Einzelkulturen des Normalagars.

Oxydase-Test: Vom Normalagar wurde eine Einzelkolonie steril entnommen, in 5ml physiol. Kochsalzlösung suspendiert und danach eine Oxydasetablette (Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, 6302 Lich) hinzugegeben; nach ein- bis zweimaligem Schütteln konnte das Ergebnis innerhalb einer Minute abgelesen werden.

Patho-Tec-Cytochromoxydasetest (CO): Auf einen mit Tetramethylparaphenylendiamindihydrochlorid präparierten Teststreifen (Fa. GOEDECKE, Freiburg) wurde eine Einzelkolonie vom Normalagar steril mit einer Platinöse aufgetragen und verrieben. Eine etwaige positive Reaktion erfolgte sofort.

Patho-Tec-Lysin-dekarboxylasetest (LD): Von einer Einzelkolonie des Normalagars wurde eine Öse Material der zu testenden Stämme in 0,4ml physiologischer Kochsalzlösung in einem kleinen Reagenzglas suspendiert, der Teststreifen mit der gelben Reaktionszone darin eingetaucht und für sechs Stunden in einem Wasserbad von 37°C inkubiert. Positive Reaktionen ließen sich häufig schon nach drei Stunden, spätestens aber nach sechs Stunden ablesen.

Mit Hilfe des API = Analytab Systems (Aug. Hedinger K.G., Stuttgart) konnten in einem Arbeitsverfahren zwanzig biochemische Tests durchgeführt werden. Das System besteht aus einer Plastikplatte, auf der 20 Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 0,12ml mit der jeweiligen gebrauchsfertigen Substanz angebracht sind.

Bei den zu prüfenden Bakterienstämmen wurde von einer axial 2mm großen, 18- bis 24 Stunden bebrüteten, frischen Einzelkolonie vom Normalagar ausgegangen. Diese wurde in 4,0ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt, danach die Röhrchen beschickt. Zu diesem Zweck kam die Testplatte, auf deren Unterseite ein Löschpapier angebracht war, in einen durchsichtigen Plastikbehälter, auf dessen gerippten Boden ca. 2ml destilliertes Wasser pipettiert wurde, damit die Suspension nicht austrocknete. Unter leichter Neigung der Platte wurde nun die vorbereitete Bakteriensuspension mittels einer 0,1ml fassenden Pipette in das Röhrchen gefüllt. Beim Einpipettieren mußte beachtet werden, daß der Tropfen seitlich in das Röhrchen gebracht wurde, da andernfalls leicht Luftblasen entstanden, die das Ergebnis beeinträchtigt hätten. Das erste Röhrchen enthielt Orthonitrophenol (ONP), einen synthetischen Indikator der β -Galaktosidase und Laktose = ONPG-Test. Es folgten der Arginin-Dehydrolase (ADH)-, Lysin-Decarboxylase (LDH)- und der Ornithin-Decarboxylase (ODC)-Test, deren positive Reaktion durch Beimengen von drei Tropfen Paraffinöl nach der Beimpfung verstärkt werden konnte. Im Röhrchen für den SIMMONSschen Citrat-Nährbodentest ist Citrat die einzige Kohlenstoffquelle, wird diese abgebaut, verändert sich der Bromthymolblauindikator von grün nach blau. Die Reaktion läuft im oberen Teil des Röhrchens ab, so daß es in diesem Fall erforderlich war, auch die Kuppel des Röhrchens zu füllen, da das Ergebnis auf der Aerobiosefläche der Kuppel abgelesen werden mußte. Die Schwefelwasserstoffbildung der zu prüfenden Bakterien wurde in dieser Testreihe durch die Zersetzung von Thiosulfat unter H_2S -Freisetzung mit Eisensalz geprüft, das bei positiver Reaktion

schwarze Ablagerungen hervorrief. Parallel dazu wurde je eine Standard-I-Bouillon (Fa. Merck, Darmstadt) (bei fraglichen Ergebnissen zusätzlich eine Leberbouillon) von 5,0ml mit den isolierten Reinkulturen beimpft und ein mit Bleiacetat getränkter Streifen Filterpapier so in das Reagenzglas verbracht, daß dieser dicht über dem Flüssigkeitsspiegel hing, ohne einzutauchen. Eine positive Reaktion konnte nach 18- bis 24stündiger Bebrütung bei 37°C als Schwärzung des Streifens (Ausfällung von Bleisulfat) festgestellt werden. Die Harnstoffbildung wurde mit dem Ureasetest nach FERGUSON im API-System überprüft; Indikator war Phenolrot. Weiter wurde die Desaminierung von Tryptophan, = TDA-Test, überprüft. Fand die Desaminierung statt, so wurde Indolpyrovatsäure freigesetzt, welche eine bräunlich-rote Verfärbung des Eisensublimates herbeiführte. Die Indolreaktion wurde wiederum doppelt überprüft. Im API-System wurde nach der 24-stündigen Inkubationszeit bei 37°C in die Kuppel des Röhrchens ein Tropfen des KOVAC'schen Reagenz gegeben, so daß sich im positiven Fall ein roter Ring bildete. Daneben wurden 5,0ml einer Nährbouillon, die mit tryptophanhaltigem Pepton angereichert war, mit dem Teststamm beimpft; nach 18- bis 24-stündiger Bebrütung erschien nach Hinzugabe von einem ml des KOVAC'schen Reagenz ein roter Ring an der Flüssigkeitsoberfläche, wenn es sich um die Spezies Escherichia coli handelte. Auch der Voges-Proskauertest wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Im API-System mußte das Röhrchen und ein Teil der Kuppel, die gepuffertes Natriumpyruvat enthielt, so gefüllt werden, daß es nach der 18- bis 24stündigen Bebrütungszeit noch möglich war, einen Tropfen 40%iger Kalilauge und einen Tropfen 1%iger alkoholischer α -Naphtollösung hinzuzugeben. Im Parallelversuch wurden 5ml einer VP-Bouillon beimpft, für 18 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert und dann vorsichtig 0,6ml einer 40%igen KOH-Lösung in das Reagenzglas pipettiert, der 0,4ml einer 6%igen α -Naphtol-Lösung folgten. Das Reagenzglas wurde dann schräg gelegt, und nach 8-10 Minuten konnte bei positiver Reaktion bei beiden Tests die Bildung eines roten Ringes beobachtet werden. Die Proteolyse von Gelatine konnte im API-System geprüft werden. Waren die Bakterien in der Lage, die Formalingelatine (nach der Art von KOHN) zu verflüssigen, so wurde ein schwarzes Pigment freigesetzt, das durch das gesamte Röhrchen diffundierte.

Weiterhin wurden auf gleiche Weise mittels eines Bromthymolblauindikators die Reaktionen auf Glukose, Mannit, Inosit, Sorbit, Rhamnose, Saccharose, Melibiose, Amygdalin und L (+) Arabinose getestet. Außerdem wurde noch die Methylrotreaktion durchgeführt, wobei wie in dem Voges-Proskauertest verfahren wurde. Nach der Inkubationszeit wurden der Bouillon drei Tropfen Methylrot zugesetzt, worauf diese sich im positiven Fall sofort kirschrot, im negativen Fall nicht verfärbte.

Die vermuteten Salmonellastämme wurden den gleichen differentialdiagnostischen Untersuchungen unterzogen wie die mutmaßlichen Enterobakterien, ausgegangen wurde in diesem Fall aber von laktosenegativen Kolonien auf dem Gassner-nährböden. Mit allen 28 Stämmen wurde dann der Serum-agglutinationstest durchgeführt. Auf einem Objektträger wurde je ein Tropfen des ORMT-Salmonella-Serums polyvalent I und II (HOECHST, Frankfurt) aufgetragen und etwas Material der zu testenden Kolonie in diesem Tropfen verrieben.

3.3. Antibiotika-Resistenz-Bestimmung

Mit allen 196 isolierten und als coliforme Keime angesehenen Bakterienstämmen sowie mit den 28 als Salmonellen vermuteten Stämmen wurde die Antibiotika-Resistenz-Bestimmung durchgeführt.

Als Nährboden fand der Sensitivity-Test-Agar (DST-Agar, Oxoid, London, Code CM 261) Verwendung. Von jedem Stamm wurde eine geringe Menge an Kolonienmaterial vom Konservierungsschrägagar entnommen und in 5,0ml einer Standard-I-Bouillon verrieben, bis es zu einer Opaleszenz kam, danach für 18 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die bebrütete Bouillon wurde dann mit 5,0ml steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und eine Öse (0,01ml) der Flüssigkeit auf einer DST-Agarplatte ausgespatelt. Auf die so vorbereiteten Agar-Platten wurden sternförmige Papierträger gebracht, deren Enden 10µg Chloramphenicol = C, 10µg Erythromycin = E, 100µg Sulphafurazol = G, 1,5 I.E. Penicillin G = P, 10µg Streptomycin = S, 10µg Tetracyclinhydrochlorid=TE, (Oxoid, Code 30-IH), 10µg Methicillin=CB, 10µg Colistin=CS, 10µg Furadantin=FD, 5µg Kanamycin=K, 10µg Neomycin = N, 5µg Novobiocin = NV, 5µg Cloxacyclin = OB und 2µg Ampicillin = PN (Oxoid Code 30-9C) enthielten.

Zur Diffusion der Antibiotika in den Nährboden wurden die Platten für fünf Stunden bei +4°C im Kühlschrank belassen; dann 18 bis 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Danach konnten diejenigen Stämme als resistent notiert werden, bei denen die Antibiotika keine Hemmung des Bakterienwachstums hervorgerufen hatten.

In einem weiteren Versuch wurden 34 mehrfachresistente Stämme nochmals mit der gleichen Methode auf ihre Antibiotikaresistenz überprüft. Dabei wurde die Beladung folgender Antibiotika erhöht: C = 50µg, P=5 I.E., S = 25µg, TE = 50µg (Multodisks, Oxoid, London, Code 30-2H), PN = 5µg und NV = 10µg (kreisförmige Papierblättchen von 6mm Durchmesser, Fa. Hoechst, Frankfurt).

3.4. Resistenzdepression mittels Trypaflavin

34 mehrfachresistente Enterobakterienstämme wurden in Anlehnung an Versuche von LEBEK (1969) daraufhin geprüft, ob sie ihre Antibiotikaresistenz (speziell ihre Tetracyclinresistenz) durch die Behandlung mit Trypaflavin verlieren.

Die Testkeime wurden von dem Konservierungsagar entnommen und in jeweils 5,0 ml einer 10⁸/ml Trypaflavin (3,6 Diamino-10 methylacridiniumchlorid + 3,6 Diaminoacridinmonochlorid; Fa. Hoechst, Frankfurt) enthaltende Standard-I-Bouillon (Fa. Merck, Darmstadt) überimpft und zweimal passagiert. Parallel dazu erfolgte der gleiche Versuch mit trypaflavinfreier Nährbouillon. Nach der zweiten Passage wurde jeweils (mit und ohne Trypaflavin) eine Öse Material (0,01 ml) auf Sensitivity-Test-Agar (Oxoid, London, Code CM 261) ausgespatelt und mit sternförmigen Papierträgern (Oxoid, London, Code 3242 S), deren Enden 10 µg C, 100 µg G, 10 µg TE, 10 µg S, 5 µg K und 2 µg PN enthielten, beschickt. Die Platten wurden dann für fünf Stunden zur Diffusion der Antibiotika bei + 4°C im Kühlschrank belassen. Die Auswertung erfolgte nach 18- bis 24stündiger Bebrütung bei 37°C.

3.5. Untersuchungen über gleichzeitiges Auftreten von Colicinogenie und Antibiotikaresistenz

34 mehrfachresistente coliforme Bakterienstämme wurden nach dem Verfahren von GEDEK, W. (1971) auf ihre Bildung von Colicin getestet.

Der Grundnährboden bestand aus:

Blood Agar Base (Oxoid)	40g
Casamino Acids (Difco)	20g
Hefeextrakt	4g
Aqua dest.	ad 1000

und einem pH-Wert von 7,2. Dieser Agar wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn angesetzt und je 20 ml davon in große Glas-

Petrischalen pipettiert. In dem Deckel der Petrischale verhinderte ein entsprechend großes Filterpapier die Bildung von Kondenswasser. Gleichzeitig wurden 5,0 ml Standard-I-Bouillon (Merck, Darmstadt) angesetzt, in die fünf Einzelkolonien des zu testenden Stammes mit einer sterilen Öse verrieben und 18 bis 24 Stunden bei 37^bC bebrütet wurden.

Mit einem genormten Metallstempel nach GEDEK~~W~~(1971) konnten in einem Arbeitsverfahren neun Stämme gleichzeitig auf ihre Colicinbildung überprüft werden. Der Unterbau des Stempels besteht aus einer Metallplatte, die in regelmäßigen Abständen neun kleine Löcher mit einem Fassungsvermögen von je einem Milliliter aufweisen; der Stempel selbst besteht aus neun schmalen Metallstiften, die in einer zweiten Metallplatte beweglich verankert sind und genau auf die untere Platte passen, er dient zur Überimpfung der zu testenden Stämme auf den Agar.

Von der vorbereiteten Bouillon wurde je Teststamm ein Milliliter in die Löcher des Stempelunterbaus pipettiert, der Stempel eingetaucht und vorsichtig auf die Platte gedrückt. Danach fand eine 48-stündige Bebrütung bei 37°C statt. Jetzt wurden die folgenden 17 international standardisierten Colicin-Typenstämme, die freundlicherweise von Herrn Prof. FREDERICQ, Liège, zur Verfügung gestellt wurden, vorbereitet:

CA. 7 = E.coli	produziert Colicin V+M
CA. 18 = E.coli	" " B+M
CA. 23 = E.coli	" " D
CA. 31 = E.freundii	" " A
CA. 38 = E.coli	" " E+I
CA. 42 = E.coli	" " F
CA. 46 = E.coli	" " G
CA. 53 = E.coli	" " I
CA. 57 = Paracoli	" " C
CA. 58 = E.coli	" " H
CA. 62 = Paracoli	" " J+I

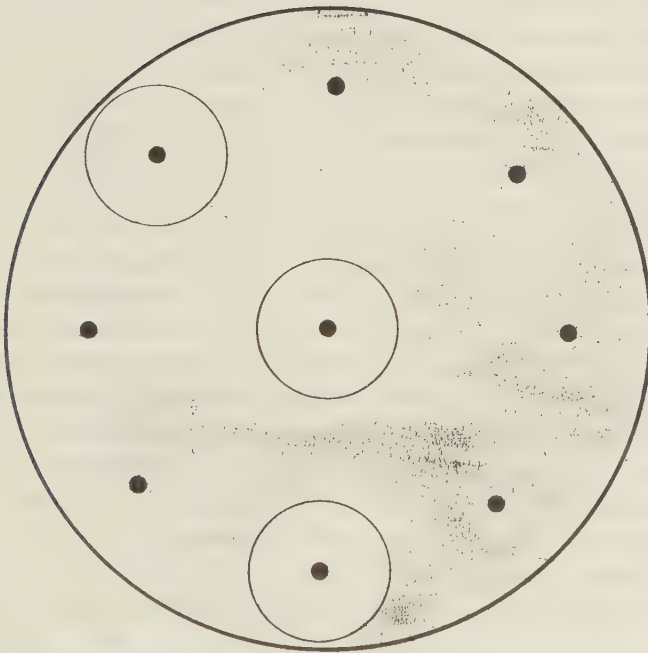
K. 235	= E.coli	produziert Colicin K+?
P1	= Sh.boydii	" " S1
P9	= Sh.sonnei	" " S3+I
P14	= Sh.dispar	" " S5
P15	= Sh. dispar	" " S4
Row	= E.coli	empfindlich für alle Colicine

Von jedem dieser Stämme wurde eine Einzelkolonie in je 5,0 ml Standard-I-Bouillon geimpft und 18 bis 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Danach wurde je eine Platinöse Medium entnommen, wiederum in eine frische Bouillon (5,0ml) verbracht und nochmals für 24 Stunden inkubiert. Jetzt wurden die Röhrchen 10 Minuten lang mit 100 U/min geschüttelt, so daß eine homogene Verteilung im Nährmedium gewährleistet war. Nach nunmehr 48-stündiger Bebrütung der Testkeime wurde auf das Filterpapier im Deckel jeder Petrischale 2,0 ml Chloroform geträufelt, das in zwei Stunden Einwirkzeit das Wachstum der Keime abtötete. Um das ganze Chloroform verdampfen zu lassen, wurden die Platten eine Stunde lang belüftet, danach mit jeweils einem Colicin-Typenstamm überschichtet, für kurze Zeit auf der Agarplatte belassen und dann wieder abgeschüttelt. Nach erneuter 18- bis 24stündiger Bebrütungszeit bei 37°C konnte dann abgelesen werden, ob und welches Colicin der getestete Stamm gebildet hatte. Der Versuch wurde mit neun colicinbildenden Bakterienstämmen wiederholt.

Außerdem wurde bei gleichem Versuchsablauf getestet, ob der Mac CONKEY-Agar No.3 (Oxoid, London, Code CM 115) für den Nachweis der Colicinbildung von Enterobakterien geeignet ist.

Abb. Nr. 2

Schematische Darstellung des Colicinnachweises auf der Agarkultur mittels punktförmiger Überimpfung der zu testenden Stämme und Überschichtung mit dem jeweiligen Colicintypenstamm.



= Wachstum des Colicintypenstammes



= zu prüfender Stamm



= colicinbildender Stamm

4. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

4.1. Anzüchtung und Isolierung von Enterobacteriaceae aus Futtermitteln

Eine Zerkleinerung der untersuchten Futtermittel erwies sich nicht als notwendig, da selbst kompaktes Preßfutter mit ca. vier Zentimeter Durchmesser in dem Anreicherungsmedium sehr schnell zerfiel.

Trotz des verwendeten Selektivanreicherungsmediums konnten auf den Kristallviolett-Galle-Laktose-Agarplatten nicht nur Enterobacteriaceae angezüchtet werden; alle isolierten Keimarten waren aber gramnegativ. Die Enterobacteriaceae bildeten auf beiden Nährbodenarten (mit und ohne Glucosezusatz) stark rötlich-violette z.T. schleimige Kolonien, die von einer mehr oder weniger stark violetten Präzipitationszone umgeben waren (Fischaugenkolonien). Gelegentlich trat diese Präzipitationszone nur unter den Kolonien auf und konnte durch Verschieben der Einzelkolonien mit der Platinöse oder einem Glasspatel leicht sichtbar gemacht werden. Häufig trat aber auch der Fall ein, daß die Kolonien auf der Kristallviolett-Galle-Laktose-Agarplatte ohne Glucosezusatz nur blaßrosa waren und im Gegensatz zu der Platte mit dem Glucosezusatz keine Präzipitationszone zeigten. Diese Kolonien wurden nach weiterer 18-bis 24stündiger Bebrütungszeit bei Zimmertemperatur dotter- bis ockergelb, und durch biochemische Tests ließ sich nachweisen, daß es sich um die sogenannten "Gelbstämme" (Flavobakterien) handelte, die auf den meisten Getreidearten physiologisch vorkommen. Diese Keimart wurde neben Sporenbildnern, gräulichen und weißen Kolonien, die nicht weiter bestimmt wurden, recht häufig beobachtet.

Außerdem konnte festgestellt werden, daß ein erhöhter Wassergehalt das Überleben der coliformen Keime begünstigte. Aus Futterproben, die drei Jahre lang feucht und kühl gelagert worden waren, konnten Enterobakterien isoliert werden; hingegen enthielten die gleichen warm und trocken gelagerten

Proben keine Enterobakterien. Die Isolierungsversuche ergaben auch, daß in stark verschimmelten Futterproben wenig oder gar keine coliformen Bakterien gefunden werden konnten; die Schimmelpilze überwucherten in allen Fällen die Agarplatten.

Bei der Auswertung der salmonellen-verdächtigen Proben wurden auf dem rötlich-bräunlichen, modifizierten Brillantgrün Agar folgende Kolonien registriert: stark rot-violette, zitronengelbe, orangefarbene, lilarote mit einem gelben Zentrum, großflächige, schleimig-gelbe mit weißen Flocken und weißlich schleimige. Die Präzipitationszonen hatten auf dem Nährboden die jeweils den Kolonien entsprechenden Farben. Da es sich bei den stark roten Kolonien, die häufig auch einen weißlichen, leicht gezackten Rand aufwiesen um Salmonellen handeln konnte, wurden diese weiter differenziert. Aus 110 Futtermitteln konnten 28 Stämme (= 25,4%) die der Gattung Salmonella anzugehören schienen, isoliert werden.

Die Isolierung von Enterobacteriaceae aus insgesamt 621 Einzelproben, die aus 207 Handelsfuttermitteln verschiedener Zusammensetzung und Herkunft waren, ergab 196 coliforme Keime. Dies entspricht, bezogen auf die Einzelproben, einem Prozentsatz von 31,6. Die Tab. Nr.7 veranschaulicht, aus welchen Futtermittelarten, die vorwiegend aus landwirtschaftlichen Betrieben stammten, Enterobacteriaceae isoliert werden konnten.

Tabelle Nr. 7

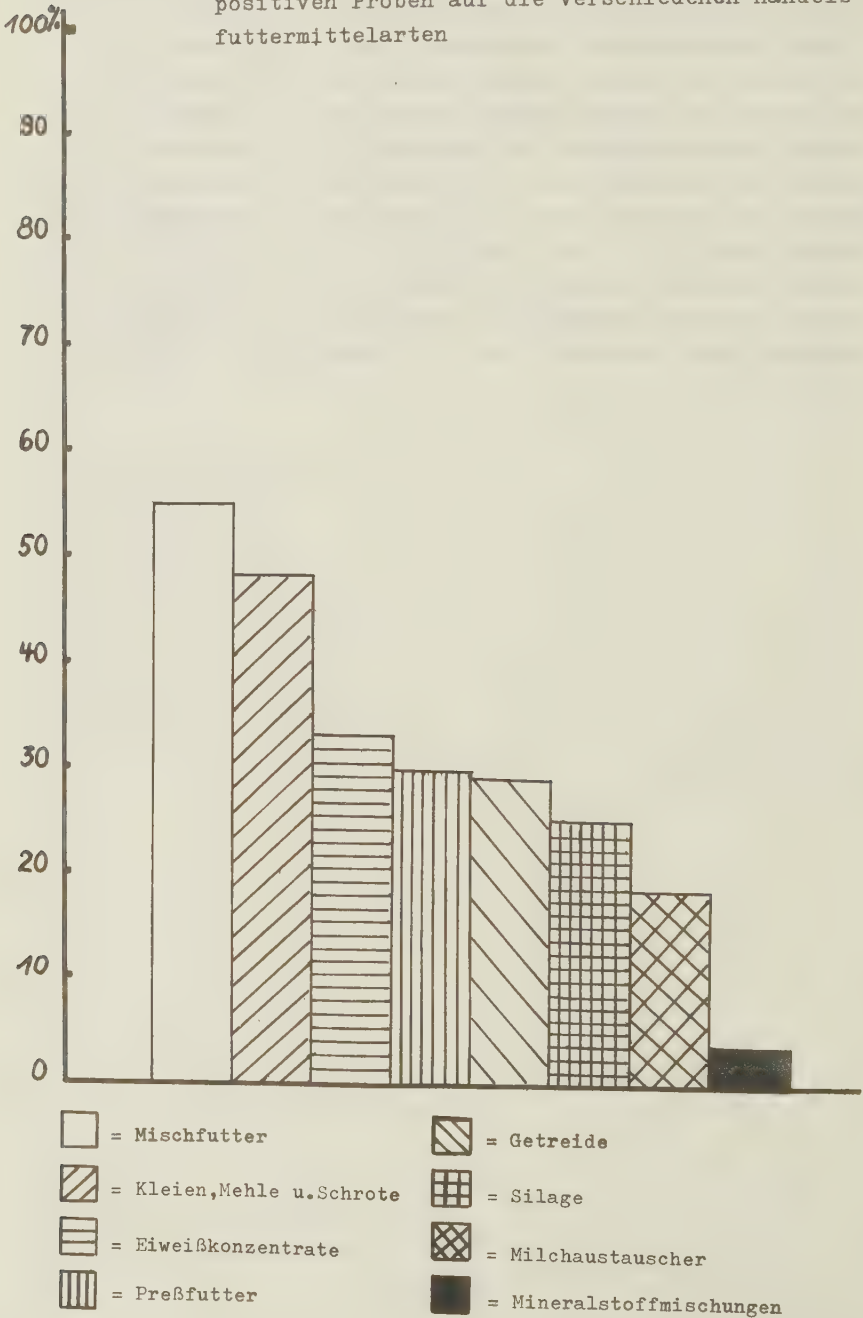
Übersicht der isolierten Enterobacteriaceae aus Handelsfuttermitteln verschiedener Zusammensetzung und Herkunft

Art der Futtermittelproben	Gesamtzahl d. Proben	Anzahl d. Enterobact.pos. Proben	In Prozent
<u>Mischfutter:</u>			
Schw., Rd., Gefl.	105	58	9,4
Milchaustauscher	54	10	1,6
Eiweißkonzentrat	6	2	0,3
Mineralstoffmischung	27	1	0,2
Preßfutter	213	63	10,1
<u>Einzelfuttermittel:</u>			
Getreide:	96	28	4,5
Hafer, Weizen, Mais, Gerste, Stroh, Heu			
Kleien, Mehle, Schrote	78	31	5,0
Hafercreme	30	—	—
Silage	12	3	0,5
Insgesamt:	621	196	31,6

Nach der Prozentualen Verteilung der Enterobacteriaceae positiven Proben auf die verschiedenen Handelsfuttermittelarten weisen die Mischfuttermittelproben (von Schweinen, Rindern und Geflügel) den höchsten Anteil coliformer Keime auf, es folgen Kleien, Mehle und Schrote, Eiweißkonzentrate, Preßfutter, Getreideprodukte, Silage, Milchaustauscher und Mineralstoffmischungen. Die Abbildung Nr. 3 veranschaulicht die gefundenen Prozentzahlen, die jedoch auf eine unterschiedliche Anzahl untersuchter Proben der einzelnen Futtermittelarten bezogen sind. Bei diesem Ergebnis ist natürlich auch noch zu berücksichtigen, daß die coliformen Keime nur mit Hilfe eines Selektivanreicherungsmediums isoliert wurden, so daß über den wirklichen Keimgehalt keine Aussagen gemacht werden können.

Abb. Nr. 3

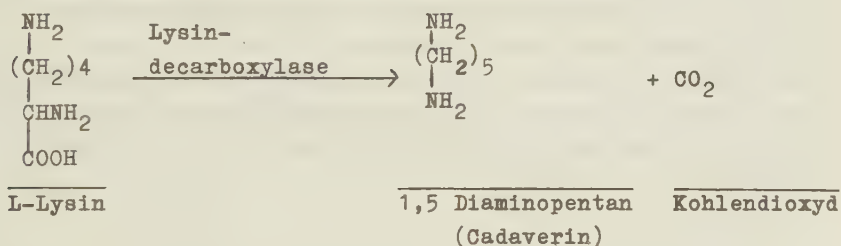
Prozentuale Verteilung der Enterobacteriaceae
positiven Proben auf die verschiedenen Handels-
futtermittelarten



4.2. Differenzierung der isolierten Enterobacteriaceae

Die ähnlich den Enterobacteriaceae wachsenden Pseudomonas-Alcaligenes- und Aeromonaskeime konnten durch den Oxydase-test ausgeschlossen werden, da diese die wasserklare Suspension nach spätestens einer Minute blaulila verfärbten. Die gleichen Keimarten zeigten auch beim Patho-Tec-Cytochromoxydasetest eine positive Reaktion, indem sie den Teststreifen dunkelblau färbten. Durch diesen Test konnten auch die oft so schwierig zu differenzierenden Flavobakterien mit Sicherheit kenntlich gemacht werden. Durch den Patho-Tec-Lysindecaboxylasetest (LD) konnten Salmönellen, die Arizonagruppe, atypische Escherichia coli einschließlich Alcalescens dispar, die Hafnia- und die Serratia-Gruppe identifiziert werden.

Die chemische Reaktion läuft folgendermaßen ab:



Das auf dem Teststreifen befindliche L-Lysin wird durch Enzyme der positiv reagierenden Bakterien decarboxyliert, wobei Cadaverin entsteht; der pH-Wert steigt an, und die Farbzone des Streifens wird blau. Fermentiert der zu testende Stamm (z.B. E.coli) die Laktose, so entsteht Milchsäure, und der pH-Wert-Anstieg wird kompensiert; infolgedessen tritt kein Farbwechsel ein. Bei positiven Reaktionen entstand häufig schon nach dreistündiger Inkubation im Wasserbad eine preußischblaue Färbung an der Umschlagszone. Andere Farbreaktionen, wie gelb, türkis und verschiedene Grüntöne, waren negativ zu beurteilen, hatten aber im Zu-

sammenhang mit weiteren Tests eine gute Aussagekraft. So zeigte sich, daß *Escherichia coli*-Keime stets eine gelbe, Klebsiellen hingegen teils gelbe, teils leicht grünliche Farbreaktionen aufwiesen. Die 20 biochemischen Tests des API (Analytab) Systems sind in der Tab. Nr. 8 zusammengefaßt und nach NYGAARD et al. (1970) sowie dem BERGEY's Manual (7.Auflage) erweitert. Es war nicht möglich, alle isolierten Bakterienstämme bis zu ihrer Artzugehörigkeit zu differenzieren. Mit den angewandten Methoden konnten jedoch 119 *Escherichia coli*-, 38 *Klebsiella*-, 13 *Escherichia hafniae*-, 5 *Escherichia cloaceae*-, 5 *Citrobacter*- und zwei der Gattung *Serratia* zugehörige Stämme bestimmt werden; 14 Bakterienstämme waren nicht zu klassifizieren.

Die Differenzierung der 28 als Salmonellen vermuteten Stämme stützte sich hauptsächlich auf den Serumagglutinationstest. Danach zeigten nur vier der 28 Stämme eine schwache Agglutination, die im Vergleich zu einer *Salmonella typhimurium* Vergleichsagglutination als negativ betrachtet wurde. Obwohl sich 11 Stämme nach ihren biochemischen Reaktionen wie Salmonellen verhielten, konnten sie nach dem Serumagglutinationstest nicht als Salmonellen diagnostiziert werden; daher enthielten die untersuchten Futtermittelproben keine Salmonellen.

Tabelle Nr. 8

Differenzierungsschema der isolierten Enterobacteriaceae aus Handelsfuttermitteln

nach Angaben des API-Systems und erweitert nach NYGAARD et al. und BERGEY's Manual (7. Auflage)

	1	2	3	4	5	9	7	8	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	ONPG	ADH	LDC	ODC	Citrat	H ₂ S	Urease	TDA	Indol	Acetoin	Gelatine	Glukose	Mannitol	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Saccharose	Melbiose	Amygladin	Arabinose	Patho-TeelD	Patho-TecCO	Methylrot	Gram-Farbg.
E.coli	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
Citrobacter	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arizona	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Salmonella	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Klebsiella	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E.aerogenes	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E.cloacae	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E.hafniae	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Serratia	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Aeromonas	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Proteus vul-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
garis																								

+ = Testergebnisse im Allgemeinen positiv
 ++ = Testergebnisse häufiger positiv
 - = Testergebnis im Allgemeinen negativ

d = verschiedenen biochemische Arten
 + = Positives Testergebnis wichtig für die Identifizierung
 - = Negatives Testergebnis wichtig für die Identifizierung

2.3. Tabelle Nr. 5

Test	positiv	negativ
1. ONHG (Laktose)	gelb	klar
2. Arginin	rot	gelb
3. Lysin	rot	gelb
4. Ornithin	rot	gelb
5. Citrat	blau	grün
6. H ₂ S	schwarz	klar
7. Urease	rot	gelb
8. Tryptophan	braun	gelb
9. Indol	rot	gelb
10. Voges-Proskauer	rot	klar-rosa
11. Gelatine	Diffusion	keine Diffusion
12. Glukose	gelb	blau-grün
13. Mannitol	gelb	blau-grün
14. Inositol	gelb	blau-grün
15. Sorbitol	gelb	blau-grün
16. Rhamnose	gelb	blau-grün
17. Saccharose	gelb	blau-grün
18. Melbiose	gelb	blau-grün
19. Amygdalin	gelb	blau-grün
20. Arabinose	gelb	blau-grün
21. Patho-Tec-LD	blau	kein Farbwechsel
22. Patho-Tec-CO	dunkelbau	kein Farbwechsel
23. Methylrot	krischrot	gelb-orange
24. Gramfärbung	blau	rot

4.3. Antibiotika-Resistenz-Bestimmung

Die nur einmal zur Erhaltung auf den Konservierungs-schrägagar überimpften 196 Enterobacteriaceae-Stämme, die aus 621 Einzelproben verschiedener Handelsfuttermittel stammten, wurden gleichzeitig auf ihre Antibiotikaresistenz geprüft. Mehrere Vorversuche waren bei der Resistenzbestimmung der isolierten Keime notwendig, um eine optimale Aussaatmenge zu erzielen, da die Beurteilung ein gleichmäßiges Wachstum von Einzelkolonien erforderte. Außerdem wurde in Stichproben überprüft, ob die Resistenzbestimmung von frisch isolierten Keimen ein anderes Ergebnis erbrachte als die Bestimmung derselben Keime, die auf dem Konservierungsagar für ca. fünf Monate aufbewahrt wurden. In allen Fällen waren die Ergebnisse gleich, so daß angenommen werden kann, daß der Konservierungsagar die vorhandenen Resistenzeigenschaften nicht beeinträchtigt.

Im ersten Versuch wurden 196 Stämme mit 14 verschiedenen Antibiotika (s.Tab.Nr.9) getestet. Alle isolierten Enterobacteriaceae wiesen Antibiotikaresistenzen auf. Zur Auswertung kamen aber nur die Bakterienstämme, die gegenüber Tetracyclinen oder Chloramphenicol resistent waren und deren Resistenz außerdem noch mit anderen Antibiotikaresistenzen gekoppelt war. 34 mehrfachresistente Stämme wurden unter 196 überprüften Enterobakterienstämmen gefunden; das entspricht einem Prozentsatz von 17,3. In der Tabelle Nr.9 wird das Resistenzspektrum und die Herkunft der gefundenen mehrfachresistenten Stämme veranschaulicht.

Eine einheitliche Resistenz aller Bakterienstämme trat gegenüber Penicillin, Methicillin, Furadantin, Novobiocin und Cloxacillin auf. Ähnlich war auch das Verhalten gegenüber Sulphafurazol; vorwiegend traten nur angedeutete Hemmhöfe innerhalb des Bakterienrasens auf, und lediglich ein Stamm war empfindlich; es konnten aber auch nur sechs Kanamycin-resistente Stämme (bei drei Stämmen resistente Einzelkolonien) und ein Neomycin-resistenter Stamm nachgewiesen werden. Eine einheitliche Sensibilität trat bei allen Stämmen gegenüber Colistin auf.

Die beschriebenen Stämme waren alle aus Futtermitteln der Jahre 1970/1971 isoliert worden; Stämme älterer Futtermittel wiesen keine Tetracyclin- bzw. Chloramphenicol-resistenz auf.

Antibiogramm von 34 antibiotikaresistenten Enterobacteriaceae-Stämmen, die aus Handelsfuttermitteln verschiedener Herkunft und Alter isoliert wurden

	St.	Coli	E.	G.	P.	S.	TE	CB	CS	FD	K	N	NV	OB	PN	Futtermittel	Herkunft: Diagn.Nr.	Alter
	15	E.coli		(+)	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	Futtermehl	119/4	(1970)
	29	E.coli	+	(+)	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	Preßfutter	137/3	(1971)
	48	E.coli	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	Weizenkleie	201/13	(1971)
	72	E.coli	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	Mischf.(gef.)	472/3	(1970)
	80	E.coli	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	Mischf.(gef.)	413	(1970)
	90	E.coli	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	Milchhaustau- schmelze	1497 a	(1970)
	100	E.coli	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	Futtermehl	1894/2	(1970)
	108	E.coli	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	(+)	Silage	331/2	(1971)
	124	E.coli	-	(+)	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	(+)	Preßfutter	666/1	(1971)
	129	E.coli	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	Futtermehl	320/1	(1970)
	151	E.coli	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	Preßfutter	747/1	(1971)
	152	E.coli	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	(+)	Preßfutter	747/1	(1971)
	153	E.coli	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	Preßfutter	747/1	(1971)
	158	E.coli	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	Eiweißkonzentr	541	(1971)
	163	E.coli	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	Silage	797	(1971)
	164	E.coli	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	(+)	Silage	797	(1971)
	181	E.coli	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	Preßfutter	-	(1971)
	187	E.coli	(+)	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	(+)	Mischf.(Schw.)	-	(1971)
	188	E.coli	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)	Mischf.(Schw.)	-	(1971)

Zu Tab. Nr. 9

Zeichenerklärungen:

- + = resistent (gleichmäßige Bakterienrasen ohne Hemmhöfe)
- (+)= freie Hemmhöfe mit Einzelkolonien in den Arealen
- ± = angedeutete Hemmhöfe innerhalb des Bakterienrasens
- = sensibel (koloniefreie Hemmhofareale)
- (in Anlehnung an LEBEK, 1969)

- - - = selbst entnommene Futtermittelproben

- C = Chloramphenicol
- E = Erythromycin
- G = Sulphafurazole
- P = Penicillin G
- S = Streptomycin
- TE = Tetracyclinhydrochlorid
- CB = Methicillin
- CS = Colistin
- FD = Furadantin
- K = Kanamycin
- N = Neomycin
- NV = Novobiocin
- OB = Cloxacillin
- PN ≠ Ampicillin

Im zweiten Antibiotika-Resistenz-Bestimmungsversuch, in dem die Konzentrationen von sechs Antibiotika erhöht wurde (Tab.Nr.10:

C = 50µg, P = 5 I.E., S = 25µg, TE = 50µg, NV = 10µg, und PN = 5µg), konnte keine wesentliche Änderung im Resistenzverhalten der untersuchten Keime festgestellt werden. Die Konzentrationssteigerung wirkte sich nur bei den Antibiotika Novobiocin und Ampicillin aus. Durch die erhöhte Beladung wurde die Resistenz gegenüber Novobiocin in fünf Fällen abgeschwächt (Stämme: E.coli 124, Klebsiella 52 und E.hafnia 91,125,146), die gegenüber Ampicillin in drei Fällen (Stämme: E.coli 48,187 und Serratia 161). Einen Vergleich beider Resistenzbestimmungen zeigt Tab.Nr.11

Wenn angedeutete Hemmhöfe innerhalb des Bakterienrasens und freie Hemmhöfe mit Einzelkolonien noch als resistent gelten können, ergab der zweite Resistenzbestimmungstest folgendes Ergebnis: 5 Bakterienstämme zeigten eine 6-fach, 10 eine 5-fach, 17 eine 4-fach- und 2 Stämme eine 3-fach-Resistenz. Die Zusammensetzung der Mehrfachresistenzen ist in Tab. Nr.12 dargestellt. Insgesamt ergaben die Versuche, daß 5,5% der untersuchten Futtermittel mehrfachresistente Enterobacteriaceae enthielten; hierbei handelte es sich überwiegend um Preßfutter (10 Stämme) und Mischfutter (8 Stämme).

Tabelle Nr.10

Antibiogramm von 34 Enterobacteriaceae mit erhöhter Be-
ladung von sechs Antibiotika

		50µg	51. µg	25µg	50µg	10µg	5µg
		C	P	S	TE	NV	PN
E.coli	St. 15	-	+	-	+	+	+
"	" 29	-	+	-	+	+	+
"	" 48	-	+	-	+	+	(+)
"	" 72	-	+	-	+	+	(+)
"	" 80	-	+	-	+	+	(+)
"	" 90	-	+	-	+	(+)	-
"	" 100	-	+	-	+	+	-
"	" 108	+	+	+	+	+	(+)
"	" 124	-	+	+	+	+	(+)
"	" 129	-	+	+	+	+	(+)
"	" 151	-	+	+	+	+	-
"	" 152	-	+	+	+	+	(+)
"	" 153	-	+	+	+	+	(+)
"	" 158	-	+	-	+	+	(+)
"	" 163	-	+	-	+	+	(+)
"	" 164	-	+	-	+	+	(+)
"	" 181	+	+	+	+	+	+
"	" 187	(+)	+	-	+	+	-
"	" 188	-	+	-	+	+	(+)
"	" 191	-	+	-	+	+	(+)
"	" 195	-	+	+	+	+	+
Klebs.	" 52	(+)	+	-	(+)	+	+
"	" 93	-	+	+	+	+	(+)
"	" 104	(+)	+	-	(+)	+	+
"	" 106	(+)	+	-	+	+	+
"	" 122	-	+	-	+	+	+
E.hafn."	91	-	+	+	+	+	-
"	" 125	+	+	+	+	+	+
"	" 146	-	+	-	+	+	(+)
E.cloac."	118	(+)	+	+	+	+	+
Citrobac.	190	-	+	-	+	+	(+)
Serratia	161	(+)	+	+	-	+	+
nicht zu	3	+	+	+	+	+	+
klassifi-	4	+	+	-	-	+	+
zierende							

Zeichenerklärung siehe Tabelle Nr. 9, Seite 57

Tabelle Nr.11

Vergleich zwischen zwei Resistenzbestimmungen mit unterschiedlicher Beladung der Antibiotika

		10µg						50µg					
		C	P	S	TE	NV	PN	C	P	S	TE	NV	PN
E.coli	St. 15	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
"	" 29	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
"	" 48	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
"	" 72	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 80	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 90	-	+	-	+	(+)	-	-	+	-	+	(+)	+
"	" 100	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
"	" 108	+	+	+	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 124	-	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)
"	" 129	-	+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	+	(+)
"	" 151	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
"	" 152	-	+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	+	(+)
"	" 153	-	+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	+	(+)
"	" 158	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 163	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 164	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 181	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)
"	" 187	(+)	+	-	+	+	(+)	(+)	+	-	+	+	(+)
"	" 188	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 191	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 195	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Klebs.	" 52	(+)	+	-	(+)	+	+	(+)	+	-	(+)	+	(+)
"	" 93	-	+	+	(+)	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
"	" 104	(+)	+	-	(+)	+	+	(+)	+	-	(+)	+	(+)
"	" 106	(+)	+	-	+	+	+	(+)	+	-	+	+	+
"	" 122	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
E.hafn.	" 91	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
"	" 125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"	" 146	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
E.cloac.	" 118	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	+	(+)
Citrobac.	" 190	-	+	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	(+)
Serratia	" 161	(+)	+	+	-	+	+	(+)	+	+	-	+	+
nicht zu	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
klassifi-	4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
zierende													

Zeichenerklärung siehe Tabelle Nr.9, Seite 57

Tabelle Nr.12

Zusammensetzung der festgestellten Mehrfachresistenzen bei
34 Enterobakterienstämmen, die aus Handelsfuttermittel
isoliert wurden

Anzahl d.Stämme	E.coli	Klebs.	E.hafn.	E.cloacae	Citrob.	Serratia	nicht zu diff.
	21	5	3	1	1		2
P,TE,NV	2	-	-	-	-	-	-
C,P,TE,NV	1	-	-	-	-	-	-
C,P,NV,PN	-	-	-	-	-	-	1
P,S,TE,NV	1	-	1	-	-	-	-
P,TE,NV,PN	10	1	1	-	1	-	-
C,P,TE,NV,PN	-	3	-	-	-	-	-
C,P,S,NV,PN	-	-	-	-	-	1	-
P,S,TE,NV,PN	5	1	-	-	-	-	-
C,P,S,TE,NV,PN	2	-	1	1	-		1

Zeichenerklärung siehe Tabelle Nr.9,Seite 57

4.4. Resistenzdepression mittels Trypaflavin

Mit der beschriebenen Methode gelang es bei 15 Stämmen (4,4%) eine Resistenzdepression bzw. einen Spontanverlust der Tetracyclinresistenz nachzuweisen. Sieben Enterobakterienstämme zeigten einerseits nach der Trypaflavinbehandlung koloniefreie Hemmhöfe (2mm), andererseits gleichmäßige Bakterienrasen ohne Hemmhöfe auf den Vergleichsplatten. Resistente Einzelkolonien wurden sensibel (5Stämme), und angedeutete Hemmhöfe innerhalb des Bakterienrasens verschwanden (3Stämme), so daß deutliche koloniefreie Areale (bis zu 3mm) notiert werden konnten.

Bei zwei Bakterienstämmen (E.coli St.153 und E.hafniae St.125) trat ein Resistenzverlust gegenüber Streptomycin auf; die trypaflavinbehandelten Stämme umgab im Gegensatz zu den nicht behandelten ein ca. 2mm großer Hemmhof. Außerdem wurde eine Sensibilitätssteigerung gegenüber Ampicillin und Kanamycin beobachtet; resistente Einzelkolonien wurden sensibel bzw. die Hemmhöfe trypaflavinpassagierter Stämme bis zu 3mm größer. Die Sensibilitätszunahme gegenüber Kanamycin trat bei vier Stämmen zusammen mit dem Spontanverlust von Tetracyclinen auf; in einem Fall konnte zusätzlich noch die Steigerung der Ampicillinsensibilität (resistente Einzelkolonien wurden sensibel) beobachtet werden.

4.5. Untersuchungen über gleichzeitiges Auftreten von Colicinogenie und Antibiotika-Resistenz

Mit Hilfe der Chloroformmethode ließen sich auf dem Agar (nach GEDÉK, W.1971) sechs Escherichia coli Stämme, zwei nicht zu klassifizierende Enterobacteriaceae-Stämme und ein Serratia-Stamm nachweisen, welche verschiedene Colicine produzierten. Ein deutlicher Hemmhof von ca. 1,5 cm Durchmesser zeigte die Bildung des jeweiligen Colicins an. Produzierte z.B. ein Stamm Colicin E+I, so war auf der mit dem Typenstamm Ca. 38 überschichteten Agarplatte eine deutliche Hemmzone ohne jegliches Wachstum sichtbar, während andere,

nicht Colicin E+I bildende Stämme von dem Typenstamm völlig überwachsen waren. Sechs von 21 *Escherichia coli*-Stämmen bildeten Colicine. Am häufigsten konnte das von vier Stämmen produzierte Colicin C nachgewiesen werden, es folgten die Colicine D, E+I und S5 (bei drei Stämmen) und die Colicine F und S (bei zwei Stämmen); einmal wurden nur die Colicine V+M, B+M, A, H, J+I, K+? und S4 gebildet. Nicht nachzuweisen waren die Colicine G und I. Wie die Tab. Nr.13 zeigt, bildete der Stamm *E.coli* 153 vierzehn von insgesamt 17 getesteten Colicinen; fünf verschiedene Colicine wurden von Stamm *E.coli* 15, vier von den Stämmen 129 und 188, zwei vom Stamm 164 und nur ein Colicin (E+I) vom Stamm 187 produziert.

Mit der angewandten Methode konnte außerdem festgestellt werden, daß zwei nicht zu klassifizierende Stämme und ein Stamm der Gattung *Serratia* Colicine bzw. colicinähnliche Substanzen aufwiesen. Der Stamm 3 produzierte Colicin G, I und S1, der Stamm 4 nur Colicin S1 und der *Serratia*-Stamm 161 14 der insgesamt 17 getesteten Colicine.

Durch die Verwendung des MacCONKEY-Agars (Oxoid, London, Code OM 115) war es nicht möglich, Colicinbildner zu ermitteln. Die Stämme, die auf dem Agar nach GEDEK, W. (1971) klare Hemmzonen zeigten, waren auf dem MacCONKEY-Agar nicht in der Lage, das Wachstum der Typenstämme völlig zu verhindern, so daß noch ein abgeschwächtes Wachstum innerhalb eines angedeuteten Hemmhofes zu erkennen war.

Was die Beziehung zwischen Colicinbildung und Antibiotikaresistenz betrifft, konnte bei diesen aus Futtermitteln isolierten *Enterobacteriaceae* kein Zusammenhang zwischen Colicintyp und einem bestimmten Resistenzmuster nachgewiesen werden. Hingegen konnte aber festgestellt werden, daß die tetracyclin- und ampicillinresistenten Stämme häufig Colicine der Gruppe E (Colicin E, F, J, S3 und S5) bildeten; diese Abhängigkeit ist in Tab. Nr.14 bei sechs von den neun Stämmen zu erkennen.

Tabelle Nr.13

Übersicht über die Colicinbildung von sechs E.coli-, zwei nicht zu klassifizierenden Enterobacteriaceae-Stämmen und einem Serratia-Stamm, die aus Futtermitteln isoliert wurden.

	<u>Escherichia coli</u>						nicht zu klassifizierende		<u>Serratia</u>
	Stamm 15	" 129	" 153	" 164	" 187	" 188	Stamm 3	4	Stamm 161
Colicin-Typenstämmenach FREDERIQUE									
CA. 7 = Colicin V+M			+						+
CA. 18= " B+M			+						+
CA. 23= " D		+	+			+			+
CA. 31= " A			+						+
CA. 38= " E+I		+	+		+				+
CA. 42= " F	+		+				+		+
CA. 46= " G									+
CA. 53= " I							+		+
CA. 57= " C	+	+	+			+			+
CA. 58= " H			+						+
CA. 62= " J+I			+						+
K. 235= " K+?			+						
P 1 = " S1			+			+	+	+	
P 9 = " S3+J	+			+					+
P14 = " S5	+		+	+					
P15 = " S4			+						+
Row = gegenüber allen Colicinen empfänglich	+	+	+			+			+

+ = colicinbildende Stämme

Beziehung zwischen Colicinproduktion und Antibiotikaresistenz von neun aus Futtermitteln isolierten Enterobacteriaceae-Stämmen.

Stämme	Nr.	COLICINE													ANTIBIOTIKA													
		V+M	B+M	D	A	E+I	F	G	I	C	H	J+I	K+?	S1	S3+J	S5	S4	Row	Colicin	Streptomycin	Neomycin	Polymyxin B	Polymyxin E	Polymyxin G	Polymyxin K	Polymyxin N	Polymyxin O	
E.coli St.	15						X			X					X	X		X	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
E.coli "	129			X		X				X								X	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
E.coli "	153	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
E.coli "	164														X	X			-	+	+	+	+	+	-	+	+	
E.coli "	187					X													(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	
E.coli "	183			X					X					X				X	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
nicht zu klassifizierende	3						X			X				X					+	+	+	+	+	-	-	-	+	
	4													X					+	-	+	+	+	-	-	-	+	
Serratia	161	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X		(+)	+	-	+	+	+	+	+	+	

X = colicinbildend

Row = allgemein colicinbildend

+ = resistent (gleichmäßige Bakterienrasen ohne Hemmhöfe)

(+) = freie Hemmhöfe mit Einzelkolonien in den Arealen

+ = angegedutete Hemmhöfe innerhalb des Bakterienrasens

- = sensibel (koloniefreie Hemmhöfeareale).

Zeichenerklärung der Antibiotika siehe Tabelle Nr. 9

5. DISKUSSION

Die erschreckend hohen Zahlen multiresistenter Enterobacteriaceae, die in den letzten Jahren in verschiedenen Untersuchungsmaterialien gefunden wurden, alarmierten nicht nur die Wissenschaft, sondern auch die Öffentlichkeit, die über Illustrierte, Funk und Fernsehen davon unterrichtet wurde, daß schon der Kontakt mit R-Faktor-tragenden Bakterien eine Übertragung auf den Menschen ermögliche und die Gesundheit bedrohe, da man kaum in der Lage ist, diese mehrfachresistenten Bakterien therapeutisch zu bekämpfen. International anerkannte Wissenschaftler wie WATANABE, DATTA, GUINEE, KAMPELMACHER, LEBEK, BULLING und KNOTHE wiesen auf mögliche Beziehungen zu den Antibiotikabeimengungen in Futtermitteln (besonders Tetracycline) hin und diskutierten, ob die Zahl der gefundenen multiresistenten R-Faktor-tragenden Enterobakterien bei Mensch und Tier deshalb so stark angestiegen sei. Andere Wissenschaftler wie van LIMBORGH (1971), JUKES (1970), COOKE (1971), KISER et al. (1970), JAROLMEN (1969) stellen diese Befunde in Frage, da es möglich war, bei Bakterien, die schon vor dem Einsatz der Antibiotika in die Tierernährung isoliert und konserviert wurden, die gleichen Resistenzeigenschaften zu finden.

In der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, ob auch Futtermittel mehrfachresistente Enterobacteriaceae enthalten und ob eine Beziehung zwischen Antibiotikaresistenz und Colicinbildung hergestellt werden kann.

Die gegenwärtigen Routinemethoden zur Züchtung, Identifizierung und Resistenzbestimmung gramnegativer Keimpopulationen in mikrobiologischen Laboratorien erwiesen sich nach LEBEK (1969) und LEGLER (1971) als nicht zuverlässig genug. Da zur Reinzüchtung und Identifizierung der isolierten Keime mehrfach Kulturpassagen nötig sind, wird in vielen Fällen das Ausscheiden von R-Faktoren in einem Teil der Wirtspopulation begünstigt, so daß sich bei nachfolgend durch-

geführten Resistenz-Bestimmungstest die passagierten Kolonien im Gegensatz zur Gesamtpopulation häufig als frei von R-Faktoren erweisen. Außerdem können Nährbodenzusätze wie Fuchsin und Resazurin, die in den Differenzierungsmedien für Enterobakterien Verwendung finden, den Spontanverlust von R-Faktoren beträchtlich erhöhen (LEBEK, 1969).

Ein primärer Resistenztest direkt vom Untersuchungsmaterial ausgehend, wie ihn LEBEK (1969) empfiehlt, konnte wegen des großen Spektrums von Keimarten in Futtermitteln nicht durchgeführt werden. In den meisten Fällen trat eine unterschiedliche Resistenz bzw. Sensibilität der Keimarten auf, die das Ergebnis verfälschte. Als praktikable Methode erwies sich dagegen die einmalige Überimpfung der isolierten coliformen Keime auf den Konservierungsagar. Diese Methode arbeitete sehr zuverlässig. Resistenztests lieferten sowohl vor der Konservierung als auch nach mehrwöchiger Aufbewahrung die gleichen Ergebnisse.

Die Anzüchtungsrate von 196 Enterobakterien-Stämmen aus 621 Einzelproben (31,6%) von 207 Handelsfuttermitteln verschiedener Herkunft ist im Gegensatz zu Untersuchungen von SCHMIDT (1968), der aus 135 Handelsfuttermittelproben 22,9% *Escherichia coli* isolieren konnte, relativ hoch. Das Ergebnis läßt keinen Schluß auf den tatsächlichen Gesamtkeimgehalt zu, da 1. die Entnahme jeweils dreier Proben von verschiedenen Stellen der Gesamtprobe, 2. die Enterobacteriaceae-Anreicherungsbouillon und 3. die Selektivnährböden die Wahrscheinlichkeit der Isolierung von Enterobakterien erhöhten. Dies erklärt auch die hohen Prozentzahlen coliformer Keime (Tab. Nr. 7) der als repräsentativ für unser Gebiet angesehenen Einzelfuttermittel.

Mit Hilfe der Anreicherungsbouillon konnten selbst aus drei Jahre kühl und feucht gelagerten Futtermitteln Enterobakterien isoliert werden, dagegen wiesen die gleichen Futtermittel bei trockener und warmer Lagerung keine coliformen Keime auf; in ähnlichen Versuchen stellte THALMANN (1971) fest, daß ein erhöhter Wassergehalt das Überleben der Bakterien in alten Futtermitteln begünstigt. Bei stark verschimmelten

Futterproben konnte das Selektivmedium das Pilzwachstum nicht unterdrücken, so daß die schon 1904 von GORDAN gemachten Beobachtungen, daß ein hoher Schimmelpilzgehalt die Anzüchtung coliformer Keime beeinflußt, auch durch uns bestätigt wurden.

Salmonellen waren in den untersuchten Futtermitteln nicht nachzuweisen. Es ist aber durchaus möglich, daß die Futtermittel trotzdem Salmonellen enthielten, die mit der beschriebenen Methode nicht zu isolieren waren. FREDERICQ (1964) stellte fest, daß eine Rekombination zwischen einem R-Faktor und einem Φ' Lac-Faktor auftreten kann. Salmonellen können z.B. durch die Infektion mit einem solchen hybriden RF-Faktor dem bakteriologischen Nachweis entgehen, weil sie zugleich mit der Resistenz auch die Laktose-Spaltungsfähigkeit erwerben.

Sowohl die Differenzierung als auch die Antibiotika-Resistenz-Bestimmung der isolierten coliformen Keime erfolgte von dem Konservierungsschrägagar (GEDEK, W., 1971), da durch mehrfaches Überimpfen der Stämme bei der Differenzierung ihre antibiotische Resistenz hätte beeinträchtigt werden können (LEBEK, 1969). Durch 24 biochemische Tests und vier Selektivnährböden konnten von 196 Enterobacteriaceae-Stämmen alle bis auf 14 klassifiziert werden: 119 *Escherichia coli*, 13 *Escherichia hafniae*, 5 *Escherichia cloaceae*, 38 der Gattung *Klebsiella*, 5 der Gattung *Citrobacter* und zwei der Gattung *Serratia*. Besonders wertvoll erwiesen sich der Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (mit und ohne Glukosezusatz), der Patho-Tec-CO- und -LD-Test sowie das API-System. Über sie war es möglich, die häufig auftretenden "Gelbstämme" von den coliformen Keimen zu differenzieren.

Eine Antibiotika-Resistenzbestimmung ist nach wie vor problematisch. Im WHO-Bericht 210 (1961) werden folgende Aussagen zur Resistenzbestimmung im Nachweisverfahren gemacht: "Einen Mikroorganismus einfach als "resistent" oder "sensibel" gegenüber Antibiotika zu beschreiben, ist, obwohl es gewöhnlich gemacht wird, nicht exakt. Der Begriff der Resistenz ist

niemals absolut und bedarf einer quantitativen Erklärung. Daher ist es angebracht, einen Mikroorganismus als sensibel bzw. resistent gegenüber einer bestimmten Antibiotikakonzentration zu bezeichnen. Die Möglichkeit "sensibel" oder "resistent" zu sein, ob quantitativ festgesetzt oder nicht, wird oft einer Bakterienart oder einem ganz bestimmten Stamm zugesprochen. Tatsächlich wird die Probe aber nur mit einer bestimmten Kultur durchgeführt, von der nur sehr wenig Material überprüft wird. Abhängig von der angewandten Technik sagt das Ergebnis eines Sensibilitätstests deshalb nur etwas über den Grad der Empfindlichkeit der meisten resistenten Individuen aus, die in dem Impfmateriel anwesend waren. Gelegentlich zeigt sich auch eine Verschiedenheit im Resistenzgrad unter den einzelnen Kolonien eines Stammes, der gerade getestet wurde. Trotz einer adaequaten Technik ist es nicht sicher, daß in einer größeren Population, von der das Testmateriel stammt, nicht doch unterschiedliche Reaktionen auftreten können, weil das Testmateriel zu klein und daher nicht repräsentativ genug war!"

Die Ergebnisse der beiden Resistenz-Bestimmungen,- bei denen im ersten Versuch 14 verschiedene Antibiotika mit den in Tabelle Nr. 9 angegebenen Konzentrationen und im zweiten Versuch sechs der gleichen Antibiotika mit erhöhter Beladung (Tabelle Nr. 10) getestet wurden, beziehen sich also nur auf die coliformen Stämme, die aus den 621 Futtermittelproben isoliert werden konnten; denn es wird nie möglich sein, für die gesamte Mikroorganismenpopulation eines Futtermittels eine repräsentative Resistenzbestimmung durchzuführen.

Mit der ersten qualitativen Antibiotika-Resistenz-Bestimmung gegenüber 14 Antibiotika konnte ein Überblick der allgemein auftretenden Resistenzen bei den aus Futtermitteln isolierten 196 Enterobakterien Stämme gewonnen werden. Einheitlich trat eine Penicillin G-Resistenz auf, die nach LEBEK (1969) und DALE (1971) infolge einer Penicillininaktivierung der Enterobacteriaceae (besonders E.coli) durch das Enzym β -Laktamase (Penicillinase, β -Laktat-aminohydrolase) bedingt ist. Außerdem waren alle Stämme überwiegend gegen Methicillin, Fura-

dantin, Moxacillin, Sulphafurazole und Erythromycin resistent, dagegen Colistin, Kanamycin und Neomycin sensibel, so daß in der zweiten Resistenz-Bestimmung diese Antibiotika nicht noch einmal mit erhöhter Beladung getestet wurden. Eine Auswahl der resistenten Stämme erfolgte auf Grund ihrer Tetracyclin- bzw. Chloramphenicolresistenz, da, besonders Tetracycline im Tierfutter dafür verantwortlich gemacht wird, die übertragbare infektiöse Resistenz der Enterobacteriaceae zu fördern. Insgesamt konnten nach Erhöhung der Antibiotikabeladung (C = 10µg auf 50µg, P = 1,5 I.E. auf 5 I.E., S = 10µg auf 25µg, TE = 10µg auf 50µg, NV = 5µg auf 10µg und PN = 2µg auf 5µg) unter 196 coliformen Stämmen 31 tetracyclin- und zwei chloramphenicolresistente Stämme (=17,3%), die außerdem noch z.T. mit Streptomycin, Penicillin, Novobiocin und Ampicillin gekoppelt waren, als mehrfachresistent nachgewiesen werden. In den verschiedenen Handelsfuttermitteln überwogen mehrfachresistente Stämme, die aus Preßfutter (10 Stämme) und Mischfutter (8 Stämme) isoliert wurden. Die Futtermittelproben stammten alle aus den Jahren 1970 und 1971, ältere Proben enthielten keine mehrfachresistenten coliformen Keime, so daß angenommen werden konnte, daß längere Lagerung einen Resistenzverlust bedingt. Folgende Resistenzmuster wurden bei den aus Futtermitteln isolierten Enterobacteriaceae gefunden: C,P,S,TE,NV,PN, = 5mal, P,S,TE,NV,PN = 6mal, C,P,S,NV,PN = einmal, C,P,TE,NV,PN = dreimal, P,TE,NV,PN = 13mal, P,S,TE,NV = zweimal, C,P,NV,PN = einmal, C,P,TE,NV = einmal, und P,TE,NV = zweimal. Die hier erhaltenen Ergebnisse können leider nicht verglichen werden, da Untersuchungen dieser Art nicht bekannt sind.

Da die Übertragung der infektiösen Resistenz in vitro schwierig durchzuführen ist (BULLING et al., 1968 u. 1970), wurde auf indirektem Weg über die Resistenzdepression mittels Trypflavin (LEBEK, 1969) versucht, die gefundenen Mehrfachresistenzen als R-Faktor-determiniert nachzuweisen.

HIROTA u. IJIIMA (1957) entdeckten die eliminierende Wirkung von Akriflavin auf autonome F-Faktoren durch Behandlung ihrer

Trägerkeime. Auch R-Faktoren ließen sich durch eine Akriflavinbehandlung der Wirtskeime eliminieren. CHABBERT u. Le MINOR (1966) beobachteten nach einer Akriflavinbehandlung immer den Verlust des ganzen R-Faktors, nie dagegen nur einzelner Resistenzdeterminanten; dagegen fand LEBEK (1969) nach einer Trypaflavinbehandlung auch einen Teilverlust. Unter den Farbstoffen Akridin, 5-Amino-Akridin, Akriflavin, Trypaflavin, Akridinorange, Atebrin und Rivanol wies LEBEK (1969) für Trypaflavin die höchste Depressionsrate (ca. 6%) bei *Escherichia coli*-Stämmen nach. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit der qualitativen Resistenzbestimmung gefunden werden, die allerdings nur eine subjektive Beurteilung des Resistenzverlustes durch Trypaflavin erlaubt. Die Depressionsrate betrug insgesamt 4,4% der Tetracyclinresistenz und war häufig mit einer Sensibilitätssteigerung gegenüber Kanamycin und Ampicillin gekoppelt. Als nachteilig erwies sich aber bei diesem Versuch, daß die wieder sensibel gewordenen Kulturen nicht ausgezählt, sondern nur ein im Gesamten auftretender Hemmhof registriert werden konnte.

Eine entwicklungsmäßige Verwandtschaft zwischen den R-Faktoren, col-Faktoren und Sex-Faktoren wiesen WATANABE u. FUKASAWA (1962), LAWRENCE u. MULCYK (1965) SICCARDI (1966) u.a. nach. Um festzustellen, ob dies auch für Enterobakterien zutrifft, die aus Futtermitteln isoliert wurden, wurde versucht, mit Hilfe des Replika-Verfahrens (GEDEK, W., 1971) die Colicinproduktion gegenüber 17 international standardisierten Colicin-Typenstämmen (FREDERICQ, Liège) zu testen. Die verwendete Methode erwies sich als vorteilhaft, da mehrere Nachweisverfahren der Colicinogenie in der Agarkultur mit berücksichtigt wurden (Methoden von FREDERICQ, 1948; HAMON, 1965 und ABBOT u. SHANNON, 1958). Die Wahl des Agars war ein wesentlicher Faktor bei der Darstellung der colicinproduzierenden Bakterien; der MacCONCEY-Agar war dem von GEDEK, W. (1971) empfohlenen Testagar unterlegen. Von den 34, von uns untersuchten mehrfachresistenten Enterobacteriaceae-Stämmen bildeten neun Stämme Colicine bzw. colicinähnliche Substanzen. Berücksichtigt man nur die colicinbildenden *Escherichia coli* Stämme, so bildeten fast ein Drittel der 21 mehrfach-

resistenten *Escherichia coli* Stämme Colicine. Nach BRANDIS und SMARDA (1971) steht der Colicintyp 14 in engem Zusammenhang mit der Vierfachresistenz von Tetracyclin, Chloramphenicol, Dihydrostreptomycin und Sulfisoxazol. Wir konnten die von ANDERSON und LEWIS (1965) gemachten Beobachtungen, daß der Colicinfaktor col E2 mit dem Resistenzfaktor Tetracyclin und Ampicillin assoziiert ist, bestätigen; nach MEYNELL (1969) bewirkt jeder dritte fi^{R} -Faktor zugleich eine Bildung von Colicin I, dies legt die Vermutung nahe, daß diese "R-Faktoren" nur ganz zufällig als R-Faktoren bezeichnet wurden und ebenso gut als col-I-Faktoren angesehen werden können. KROMERY u. JANOUSKOVA berichteten 1969 über die Fähigkeit eines nicht definierten col-Faktors, die Mobilisierung der RT-Determinanten (Resistenz gegenüber Tetracyclinen) zu bewirken. Diese Feststellung kann durchaus für die sechs *Escherichia coli*-Stämme zutreffen, da alle tetracyclinresistent waren. Die Untersuchungen über das Vorkommen von R-Faktor-tragenden und colicinbildenden Enterobacteriaceae zeigen, daß auch in Handelsfuttermitteln mehrfachresistente Enterobakterien vorkommen können, die Colicine bilden. Darüberhinaus deutet sich eine Beziehung zwischen Mehrfachresistenz und Colicinproduktion an.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. 207 Handelsfuttermittel verschiedener Herkunft und Zusammensetzung wurden auf das Vorkommen von Enterobacteriaceae untersucht. Außerdem wurden 110 dieser Futtermittel speziell auf Salmonellen überprüft.
2. Mit Hilfe der Enterobacteriaceae-Anreicherungsbouillon (Oxoid, London, Code CM 317) konnten 196 coliforme Keime (=31,6%) aus den Futtermitteln isoliert werden. Hingegen war es nicht möglich, mit der modifizierten MÜLLER-KAUFFMANN-Tetrathionatbouillon (Oxoid, London, Code CM 343) Salmonellen nachzuweisen.
3. Von den zur Differenzierung verwendeten Tests waren die Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (mit und ohne Glukosezusatz), das API-System, der Patho-Tec-CO- und -LD-Test brauchbar. Es gelang damit, 119 *Escherichia coli*-, 13 *Escherichia hafniae*-, 5 *Escherichia cloacae*-, 38 *Klebsiella*-, 5 *Citrobacter*- und 2 *Serratia*-Stämme zu bestimmen. 14 der isolierten coliformen Stämme waren nicht zu klassifizieren.
4. 34 der isolierten Stämme waren mehrfachresistent. Insgesamt enthielten 5,5% der untersuchten Handelsfuttermittel mehrfachresistente Enterobacteriaceae; Futtermittel, die älter als ein Jahr waren, wiesen keine mehrfachresistenten Stämme auf.
Es kamen folgende Resistenzmuster vor: C,P,S,TE,NV,PN = 5mal, P,S,TE,NV,PN = 6mal, C,P,S,NV,PN = einmal, C,P,TE,NV,PN = dreimal, P,TE,NV,PN = 13mal, P,S,TE,NV = zweimal, C,P,NV,PN = einmal, C,P,TE,NV = einmal und P,TE,NV = zweimal.
5. Bei 4,4% der Stämme ließ sich die R-Faktor determinierte Resistenz auf indirektem Weg über die Resistenzdepression mittels Trypaflavin nachweisen. Der Verlust bzw. die Depression der Tetracyclinresistenz trat häufig zusammen mit einer Sensibilitätssteigerung gegenüber Kanamycin und Ampicillin auf.
6. Zwischen der Colicinproduktion und der Antibiotikaresistenz bestanden Beziehungen. Sieben von neun colicinbildenden Stämmen produzierten Colicine der Gruppe E und waren gegenüber Tetracyclinhydrochlorid und Ampicillin resistent.

SUMMARY

207 animal feedstuffs, usual in trade, were investigated for enterobacteriaceae. Moreover 110 of these feedstuffs were examined specially for salmonellae. With the aid of E.E.-broth (Oxoid, London, Code CM 317) it was possible to isolate out of these feedstuffs 196 coliforme bacteria ($\approx 31,6\%$). Whereas by modified MÜLLER KAUFFMANN Tetrathionat broth (Oxoid, London, code CM 343) it was not practicable to cultivate salmonellae. Kristallviolet bile lactose agar (with or without glucose), API System, Patho Tec CO- and - LD test were useful to differentiate the isolated bacteria. Successfully defined were 119 *Escherichia coli*-, 13 *Escherichia hafniae*-, 5 *Escherichia cloaceae*-, 38 *Klebsiella*-, 5 *Citrobacter*- and two *Serratia* clones; 14 cultures of coliforme bacteria were not to be identified. 34 strains of isolated bacteria were multiple resistant; samples of feedstuffs older than one year, did not contain multiple resistant coliforme bacteria. Following patterns of resistance were found: C,P,S,TE,NV,PN = five times, P,S,TE,NV,PN = six times, C,P,S,NV,PN = once, C,P,TE,NV,PN = three times, P,TE,NV,PN = 13 times, P,S,TE,NV = twice, C,P,NV,PN = once, C,P,TE,NV = once and P,TE,NV = twice. By means of resistance depression of Trypaflavin it could be demonstrated that 4,4% enterobacteriaceae clones were R-Factor determined. Loss, respectively depression of resistance to tetracyclines was often accompanied by enhanced sensibility for kanamycin and ampicillin. Correlations between production of colicin and resistance against antibiotics were traceable. Seven of nine colicin producing clones produced colicins of group E and were at same time resistant to tetracyclin-hydrochlorid and ampicillin.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbot, J.D., Shannon, R. 1958
A method for typing *Shigella sonnei* using colicine production as a marker.
J.clin.Path. 11, 71-79
2. Achtman, M., Willets, N., Clark, A.J.P. 1971
Beginning a Genetic Analysis of Conjugational Transfer Determined by the F-Factor in *Escherichia coli* by Isolation and Characterization of Transfer-Deficient Mutants.
J.Bacteriol. 106, 529-538
3. Adelberg, E.A., Pittthard, J. 1965
Chromosomenübertragung bei Bakterieller Konjugation.
Bact.Rev. 29, 161-172
4. Adelberg, E.A., Pittthard, J. 1960
Genetic variation in the sex factor of *Escherichia coli*.
J.Bacteriol. 79, 321-334
5. Aikiba, T., Koyama, K., Kimura, S., Fukushima, T. 1961
Studies on the mechanism of transfer of Drug Resistance in Vivo.
Med.Biol.Tokyo, 59, 185-188
6. Anderson, E.S. 1965
Origin of Transferable Drug-Resistance Factors in the Enterobacteriaceae.
Brit.Med.J. 2, 1289-1291
7. Anderson, E.S., Lewis, M.J. 1965
Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*.
Nature, Lond. 208, 843-84
8. Anderson, E.S. 1967
Facteurs de Transfer et Résistance aux Antibiotiques chez les Entérobactériaceae.
Annales Inst.Pasteur, Paris, 112, 547-563
9. Anderson, E.S. 1968
Drug Resistance in *Salmonella typhimurium* and its Implications.
Brit.Med.J. 8, 333-339; ref.Vet.Bull. 39, 3, 1969

10. Anderson, E.S. 1969
Practical Significance of Extrachromosomal Elements.
J.gen.Microbiol. 55
11. Anderson, E.S. 1970
Observations on the Ecological Effects of Anti-bacterial Drugs.
Resistance to infectious Diseases ed.R.H.Dunlop
u.H.W.Moon - Saskatoon Modern Press, 157-172
12. Anzai, H., Nakamura, M. 1968
Änderung der Arzneimittelresistenz bei Shigella,
Salmonellae und Escherichia coli.
Kitasato Arch.exp.Med. 41, 11-23
13. Bauer, A.W. 1964
Der gegenwärtige Stand der Resistenz der Bakterien
gegen Sulfonamide.
Chemotherapia (Basel), 9, 88-95
14. Beale, G.H. 1969
Comparison of Bacterial and other Extrachromosomal
Genetic Elements.
J.gen.Microbiol. 55, vii-viii
15. Ben-Hamida, F., Gros, F. 1971
Transcription and Translation mechanisms in a
"permeabilized" E.coli system.
Biochemie, 53, 71-80
16. Benveniste, R., Davis, J. 1971
Enzymatic Acetylation of Aminoglycoside Antibiotics
by Escherichia coli Carrying an R-Factor.
Biochemistry, N.Y. 10, 1787-1796
17. Bergey, D.H. 1954
Bergey's Manual of determinative Bacteriology.
7. ed. Repr. Williams & Wilkins
18. Bisping, W. 1963
Schattenseiten der Antibiotikaaanwendung beim Geflügel.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 70, 145-152
19. Bobrowski, M. 1970
The Transfer of intrinsic resistance of Penicillins
in Enteric Bacteria by an R Factor.
Arch. Immun.Ther.Exp. 18, 225-229

20. Brandis, H. 1964
Die experimentelle Übertragung von Arzneimittel-
resistenz unter Bakterienstämmen.
Wiss. Zeitschr. Karl-Marx-Univ. Leipzig, math. nat.
R. 13, 1093-1097
21. Brandis, H., Šmarda, J. 1971
Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
22. Bresch, J. 1970
Klassische und molekulare Genetik.
Springer Berlin-Göttingen Heidelberg
23. Brinton, C., Gemski, P., Carnahan, J. 1964
A new type of Bacterial Pilus Genetically controlled
by the Fertility Factor of E.coli K 12 and its Role
in Chromosome Transfer.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 52, 776-783
24. Bryson, V., Szybalski, W. 1955
Microbial Drug Resistance.
Advances in Genetics, VII, 1-46
25. Bulling, E., Stephan, R. 1970
Untersuchungen zur übertragbaren Antibiotikaresistenz
bei Darmkeimen.
Zentbl. VetMed 17, (B), 121-124
26. Bulling, E., Scholz, M., Malla, D.S. 1968
Antibiotikaresistenz von Enterobakterien aus Tier-
material und Versuche zur Übertragung der Mehr-
fachresistenz in vitro.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 81, 151-153
27. Bürgy, F. 1970
Die wirtschaftliche Bedeutung der Wirkstoffe in der
Tierernährung.
DLG-Verlag, Band 125, Frankfurt/Main
28. Burmann, G.L., Nordström, K., Borman, H.G. 1968
Resistance of E.coli to Penicillins. V. Physiolo-
gical Comparson of two Isogenic Strains, one with
Chromosomally and one with Episomally Mediated
Ampicillin Resistance.
J.Bacteriol. 96, 438-446

29. Shabbert, Y.A., LeMinor, L. 1966
Transmission de la résistance a plusieurs anti-
biotiques chez les Entérobactériaceae.
Presse méd. 74, 2407-2412
30. Shabbert, Y.A., Baudens, J.G., Bouanchaug, D.H. 1969
Eléments d'une Epidemiologie des Facteurs de Re-
sistance.
Cahiers Méd. vétérin. 38, 253-261
31. Clark, A.J., Adelberg, E.A. 1962
Bacterial Conjugation.
Ann. Rev. Microbiol. 16, 289-319
32. Clowes, R.C. 1961
Colicin factors as fertility factors in bacteria:
Escherichia coli.
Nature 190, 986-993
33. Clowes, R.C. 1963
Co-operation of two sex factors in Escherichia coli
K 12.
Biochem.biophys.Res.Comm. 13, 449-453
34. Clowes, R.C., Hausmann, C., Nisioka, T., Mitani, M. 1968
Interactions of Col B and R-Factors and electron
microscopy of R-Factor DNA.
Proc. XII. internat.Congress Genetics, Tokyo, 2,
241-47
35. Clowes, R.C., Hausmann, C., Nisioka, T., Mitani, M. 1969
Genetic Analysis of Col B Factors and Identi-
fication of Composite Circular Molecules of R-Factors.
J.gen.Microbiol. 55 iv
36. Cooke, E.M., Breaden, A.L., Shooter, R.A., O'Farrel, S.M., 1971
Antibiotic Sensitivity of Escherichia coli iso-
lated from Animals, Food, Hospital Patients, and
normal People.
Lancet, 7714, 8-10
37. Dale, J.W., Smith, J.F. 1971
The Purification and Properties of β -Lactamase
Specified by the Resistance Factor R-1818 in
Escherichia coli and Proteus mirabilis.
Biochem.J. 123, 493-500

38. Dale, J.W. 1971
Characterization of β -Lactamase Specified by the
Resistance Factor R 1818 in *E.coli* K 12 and other
gram-Negative Bacteria.
Biochem.J. 123, 501-505
39. Datta, N. 1962
Transmissible drug resistance in an epidemic strain
of *Salmonella typhimurium*.
J.Hyg., Camb. 60, 301-310
40. Datta, N. 1965
Infectious Drug resistance.
Nature 208, 239-241
41. Datta, N. 1969
The Vectors of Antibiotic Resistance in Bacteria.
The Scientific Basis of Medicine Annual Reviews,
Sonderdruck, 268-277
42. Datta, N. 1969
Drug-Resistance and R-Factors in the Bowel Bacteria
of London Patients before and after Admission to
Hospital.
Brit.med.J. 2, 407-411
43. Datta, N. 1971
Transferable Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*.
Proc.Soc.Med. 64, 553-558
44. Datta, N. 1971
Infectious Drug Resistance: Mikrobiologische und
genetische Grundlagen.
Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie,
Frankfurt/Main, Okt. 71
45. Demerec, M. 1955
Microbial drug resistance.
Public Helth Rep.(Wash.) 70, 817-843
46. Demerec, M. 1957
Drug Resistance in microorganisms.
Ciba-Foundation, Symposium, Churchill, London, 47-51

47. Dobozy, A., Hammer, H. 1969
R-Faktor bei *Acidobacter anitratus* Stämmen verschiedene Antibiotikaresistenzgrade mittels Konjugation auf *E.coli* und Auslöschung des R-Faktors durch Acridinorange.
Univ.Mikrobiol.Inst.Szeged, Sonderdruck
48. Egawa, R., Oshima, H., Kawaharada, U., Kono, M., Mitsuhashi, S. 1964
Impairment of antimicrobial activity of streptomycin by increase in salt concentration.
Gunma, J.med.Sci. 3, 171-173
49. Ennis, H.L. 1971
Mutants of *Escherichia coli* sensitiv to Antibiotics.
J.Bacteriol. 107, 486-490
50. Entel, H.J., Förster, N., Hinkers, E. 1970
Futtermittelrecht mit einschlägigen Bestimmungen, Bundesgesetzen, Verordnungen, Erlassen und Recht der Europäischen Gemeinschaften.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
51. Falkow, St., Citarella, R.V., Wohlhieter, J.A., Watanabe, T. 1962
Genetic Homology between *Escherichia coli* K 12 and *Salmonella*.
J.Bacteriol. 84, 1303-1312
52. Falkow, St., Citarella, R.V., Wohlhieter, J.A., Watanabe, T. 1966
Molecular Nature of the Resistance-Transfer-Facotr.
J. molec. Biol. 17, 102-116
53. Falkow, St. 1969
The physical Demonstration and Characterization of Extrachromosomal Elements.
J.gen.Microbiol. 55, ii
54. Franklin, T.J., Godfrey, A. 1965
Resistance of *Escherichia coli* to Tetracyclines.
Biochem.J. 94, 54-60
55. Franklin, F.J. 1967
Resistance of *Escherichia coli* to Tetracyclines.
Biochem.J. 105, 371-378

56. Fredericq, P. 1948
Apparition spontanée de mutants résistant aux colicines.
C.r.Soc.Biol. 142, 853-857
57. Fredericq, P. 1948
Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae.
Rev.belgePath.exp.Méd.exp. 19,suppl. 4, 1-7
58. Fredericq, P. 1964
Colicines et colicinogenic factors: a review.
Annales Inst.Pasteur,Paris, 107, 7-15
59. Fredericq, P. 1969
The recombination of colicinogenic factors with other episomes and plasmids.
Bacterial episomes and plasmids (ed.: Wolstenholme, G.E.W., O'Conner,M.)
London
60. Frydman, A., Meynell, E. 1969
Interactions between de-repressed F-like F₂-factors and wild type colicin B factors: Superinfection immunity and repressor susceptibility.
Genet.Res. 14, 315-321
61. Fullbrook, P.D., Elison, S.W., Slocombe, B. 1970
R-factor mediated β -Lactamase in Pseudomonas aeruginosa.
Nature 226, 1054-1056
62. Gardener, J.F. 1950
Some antibiotics formed by Bacterium coli.
Brit.J.exp.Path. 31, 102-107
63. Gedanken zum Swann Report 1970
Mitt.Tierhaltung, Nr. 126
64. Gedeck, W., Weinmann, N. 1971
Routineverfahren zum Nachweis der Sensibilität Koagulase negativer boviner Micrococcaceae gegenüber bacteriocinähnlichen Substanzen.
Zentb. VetMed. 18, (B), 819-823
65. Geissler, E. 1964
Genetische Grundlagen der Resistenzentwicklung bei Mikroorganismen.
Wiss.Zeitschr.Karl-Marx-Univ.Leipzig, math.nat.R. 13, 1087-1091

66. Giammanco, G. 1969
La Resistanza Multipla transmissible negli Enterobacteri.
Boll. Inst. sieroter. milan. 47, 483-490, 1968;
ref. Zentbl. Bakt. Parasit. Kde I Ref. 217, 348, 1969
67. Giammanco, G., Natoli, D. 1971
Analisi Genetica Di Complessi R in Stipiti
Selvaggi di Enterobacteri Pathogeni.
Boll. Della Societa Italiana di Biol. Sperimentale,
XLVII, 15-16, 443-446
68. Gillessen, G.J., Gillessen, M. 1960
Die Resistenzbildung bei Mikroorganismen.
Ergebnisse Microbiol. 33, 128-241
69. Ginoza, H.S., Painter, R.B. 1964
Genetic Recombination between Resistance-Transfer-Factor and the Chromosome of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 87, 1339-1345
70. Gordan, P. 1904
Bakteriologische Untersuchungen zur Beurteilung
von Kleien nach ihrer Neigung von Schimmelbildung.
Landwirtsch. Versuchsstat. 60, 73-102
71. Gounelle, H. 1968
Der Standpunkt der Medizin hinsichtlich der Anwendung von Antibiotika in der Tierernährung.
Schweizer Arch. Tierheilk. 110, 52-59
72. Gratia, A. 1925
Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre
deux souches de colibacille.
C.r. Soc. biol. 93, 1040-1044
73. Gratia, A., Fredericq, P. 1946
Diversité des souches antibiotiques de B. coli et
e'tendue varriable de leur champs d'actions.
C.r. Soc. biol. 140, 1032-1039
74. Guinée, P.A.M. 1968
Overdraagbare resistantie tegen antibiotica en
chemotherapeutica bij Enterobacteriaceae.
Tijdschr. Diergeneesk. 93, 485-497

75. Guinée, P.A.M. 1971
Vorkommen von R-Faktor tragenden Enterobacteriaceae-Stämmen beim Tier.
Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, Okt.71
76. Graevenitz von A., Nourbadsh, M. 1972
Antimicrobial Resistance of the Genera Proteus, Providencia and Serratia with Special Reference to Multiple Resistance Pattern.
Med.Microbiol.Immunol. 157, 142-148
77. Haenel, H. 1964
Die Bedeutung antibiotischer Faktoren in der Nahrung.
Wissenschaftl.Zeitschr.Karl-Marx-Univ., Leipzig
13, math.nat. R.5, 1109-1112
78. Halbert, S.P. 1948
The antagonisme of coliform bacteria against Shigella.
J.Immunol. 58, 153-156
79. Hamon, Y. 1965
Les bactériocines et substances analogues.
Path.Biol. 13, 806-846
80. Hamon, M.M.Y., Chabbert, Y.A. 1970
Relations entre facteurs colicinogènes et facteurs de résistance chez une souche de S.panama.
C.r.Acad.Sci., Paris, 271, 259-262
81. Hamon, Y., Péron, Y. 1965
Étude des propriétés inductrice de certaines colicines.
C.r.Acad.Sci., Paris, 260, 5984-5961
82. Harada, K., Kameda, M., Suzuki, A., Kakinuma, Y., Mitsuhashi, S. 1961
Drug-Resistance of Enteric Bacteria. 13) Interference of R-factors in the R⁺ Bacterial Cell when Infected with Another R-factor.
Gunma, J.med.Sci 15, 201-205
83. Harada, K., Kameda, M., Suzuki, M., Mitsuhashi, S. 1964
Drug Resistance of Enterobacteria. III. Der Erwerb der Übertragungsfähigkeit des nicht übertragbaren r(TC)-Faktors in Zusammenwirken mit dem F-Faktor unter Bildung von FR (TC).
J.Bacteriol. 88, 1257-1265

84. Hashimoto,H., Honda,T., Morimura,M., Tanaka,S., Nakano,T., Mitsuhashi,S. 1961
Drug-Resistance of Enteric Bacteria. 14) Interference between R(CM) and R(TC) factors in the $R^+(TC)$ bacteria when infected with either one of both factors.
Gunma,J.med.Sci. 15, 206-208
85. Hauduroy,P., Papavassiliou,J. 1962
De l'hétérogénéité des souches d'Escherichia coli productrices de colicine.
Annales Ist. Pasteur,Paris, 102, 644-647
86. Hayes,W. 1969
Society for General Micrology. Symposium: Extrachromosomal Genetic Elements in Bacteria.
J.gen.Microbiol. 55, I-VIII
87. Hayes,W. 1965
The genetics of bacteria and their Viruses.
Oxford,Blackwell Publ.
88. Hilliger,H.G. 1969
Zur Problematik der bakteriologischen Futtermitteluntersuchungen und -beurteilungen.
Sonderdruck, Fachverband der Futtermittelindustrie.V. Hamburg
89. Holland,J.B. 1967
Bacteriocines.
Antibiotics 1, (ed.: Gottlieb,D.,Shaw,P.D., Springer, Berlin-Heidelberg-New York)
90. Hörter,R. 1968
Kulturelle Keimzählung an pelletierten Futtermittelpuben.
Zentbl. Bakt. ParasitKde,I.Org. 207, 248
91. Hutt,R.B. 1970
Genetic Resistance to Infection.
Resistance to infectious Diseases ed.R.H.Dunlop u.H.W.Moon - Saskatoon Modern Press, 1-11

92. Jjiima, T. 1962
Transfer of a colicinogenic factor with multiple
resistance factor in *Escherichia coli* K 12.
Jap.J.Genetics 37, 187-193
93. Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, L., Wollman, E.L. 1966
Symposia Biologica Hungarica.
Sammelwerk Red. Györry
94. Jacob, F., Wollmann, E.L. 1961
Sexuality and the Genetics of Bacteria.
New York/London
95. Jacob, F., Wollman, E.L. 1965
Episomic Elements in bacteria.
Symposium Soc.gen.Microbiol. 10, 67-91
96. Jarolmen, H. 1969
Die übertragbare Antibiotikaresistenz bei Haustieren.
Mitt.Tierhaltung 121, 22-26
97. Jinks, J.L. 1967
Extrachromosomale Vererbung.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
98. Jukes, T.H. 1966
15 Jahre Chlortetracyclin in Futtermitteln.
Mitt. Tierhaltung 100, 4-8
99. Jukes, T.H. 1970
Antibiotika im Futter - gegenwärtige Perspektiven.
Mitt.Tierhaltung 127, 15-20
100. Kampelmacher, E.H. 1964
Antibiotika in Lebens- und Futtermitteln.
Tijdschr. Diergeneesk. 89, 1923-1932
101. Kampelmacher, E.H., Manten, F.G., Guinee, P.A.M. 1969
Foods of animal origin as a vehicle for transmission
of drug-resistant organisms to animals and man.
Reprinted from the Use of Drug in Animal Feeds Pub.
1679
Nat.Acad.Sci.Wash.D.C.
102. Kewitz, H. 1970
Antibiotika in der Tierernährung.
Zentbl. VetMed. 17, (B), 116-119

103. Khatoon, H., Lyer, R.V. 1971
Stable coexistence of Rfi⁻ factors in *Escherichia coli*.
Canad. J. Microbiol. 17, 669-675
104. Kiser, J.S., Gale, G.O., Kemp, G.A. 1969
Resistance to Antimicrobial Agents.
Adv. appl. Microbiol. 11, 77-100
105. Kiser, J.S., Kemp, G.A., Jarolmen, H. 1970
Die Bedeutung für Fütterungsantibiotika für das
Entstehen der übertragbaren Antibiotikaresistenz.
Mitt. Tierhaltung 125, 3-5
106. Klastersky, J., Debusscher, L., Cappel, R., Swings, G.,
Daneau, D. 1971
Determination of Antibiotic Sensitivities of Gram-
Negative Bacilli (Comparison of Single-Disc and
Inoculum-Replicating Methods).
European J. Clin. Biol. Res. 4, 391-394
107. Knothe, H. 1963
Langfristige nutritive Anwendung von Antibiotika
in der Tierernährung im Hinblick auf die menschliche
Gesundheit, mit besonderer Berücksichtigung von
Chlortetracyclin.
Münch. med. Wschr. 105, 173-181
108. Knothe, H. 1967
Antibiotische Stoffe in der Tierhaltung und mögliche
Rückwirkungen auf den Menschen im Hinblick auf
Allergie und Bakterienresistenz.
Dtsch. Tierärztebl., Wiesbaden, 15, 26-29
109. Kondo, E., Mitsushashi, S. 1962
Drug Resistance of Enteric Bacteria. 15) Inte-
gration of R-factor to the chromosomes of host
bacteria.
Gunma, J. med. Sci. 11, 59-62
110. Krčméry, V., Janoušková, J. 1969
Mutual relations of colicinogenic factors and re-
sistance determinants in *Escherichia coli*.
Z. allg. Microbiol. 9, 191-195

111. Krčméry, V., Janoušková, J. 1969
Transferable tetracycline resistance in *Salmonella typhimurium* and *Shigella sonnei* derived from resistant strains of *E. coli*.
Z. allg. Microbiol. 9, 397-398
112. Krčméry, V. 1971
Mobilisierung von RT-Determinanten durch verschiedene Sex-Faktoren.
Vortrag, Paul Ehrlich-Gesellschaft, Frankfurt, Okt 71
113. Krčméry, V., Kettner, M. 1970
Infektiöse Resistenz und Antibiotikatherapie.
Umschau in Wissenschaft und Technik 70, 772-776
114. Kudlay, D.G., Balanin, N.V. 1968
Kolicinogeny. V-if-factory stamma *Escherichia coli* i ich povědenije pro konjugaciji.
Genetica 4, 71-77
115. Lawn, A.M. 1966
Morphological features of the pili associated with *Escherichia coli* K 12 carrying F-factors of the F-factor.
J. gen. Microbiol. 45, 377-382
116. Lawrence, K.M., Mulczyk, M. 1965
The transfer of two episomes, colicinogenic factor I and resistance transfer factor, in *Shigella flexneri* strains by crosses between strains each possessing a single episom.
J. gen. Microbiol. 39, 209-223
117. Lebek, G. 1969
Die infektiöse bakterielle Antibiotikaresistenz.
Verlag H. Huber, Bern und Stuttgart
118. Lederberg, J., Lederberg, E.M., Cavalli, L.L. 1952
Sex compatibility in *Escherichia coli*.
Genetics 37, 720-730
119. Leduc, A. 1966
Empfindlichkeit und Resistenz von Bakterien gegenüber Penicillinen.
Chemotherapie, (Basel), 11, 186-191

120. Legler, F. 1971
Resistenzwandel und Resistenzlage bei wichtigen pathogenen Bakterienarten.
Arzneimittel Forsch. 21, 328-330
121. Legler, F. 1971
Bakterielle Mehrfachresistenz und therapeutische Möglichkeiten aufgrund von Laboratoriumserfahrungen.
Arch.Hyg. 154, 517-523
122. Lichoděd, V.G., Kudlay, D.G. 1963
Koliciny entěropathogennych kišečnych paloček i ich tipirovanie po specifičnosti rezistentnych k nim mutanov.
Ž.mikrobiol.epiděmiol.immunol. 5, 128-134
123. Lichoděd, V.G., Kudlay, D.G. 1963
Koliciny entěropathogennych kišečnych paloček i ich tipirovanie po specifičnosti rezistentnych k nim mutanov.
Ž.mikrobiol.epiděmiol.immunol. 7, 116-120
124. Lienert, E. 1970
Verwendung der Antibiotika in der Tierernährung.
Wiener tierärztl.Mschr. 57, 422-426
125. Ludford, C.G., Lederer, M. 1963
The antibiotics of E.coli.
Austral.J.exp.Biol.med.Sci. 31, 553-559
126. Manson, E.R. 1968
Antibiotics in Animal Feeds.
Austral.veterin.J. 44, 169-173
127. Markov, K.I. 1964
Lebensäußerungen der antibiotikaresistenten Mikroorganismen.
Wiss.Zeitschr. Karl-Marx-Univ., Leipzig, math.nat.R. 13, 1103-1108
128. Merckenschlager, M. 1965
Einfluß des Zusatzes von Antibiotika zum Futter auf die Mikroorganismenflora von Nutztieren.
Arch.Hyg.Bakteriol. 149, 659-668

129. Meynell, E., Datta, N. 1966
The nature and incidence of conjugation factors in *Escherichia coli*.
Genet. Res. Camb. 7, 141-148
130. Meynell, E., Datta, N. 1966
The relation of resistance transfer factor¹ to ϕ , a F-factor (sex-factor) of *Escherichia coli* K 12.
Genet. Res. Camb. 7, 134-140
131. Meynell, E., Meynell, G.G., Datta, N. 1968
Phylogenetic Relationships of Drug-Resistance Factors and other Transmissible Bacterial Plasmids.
Bacteriol. Rev. 32, 55-83
132. Meynell, G.G. 1969
Exclusion superinfection immunity and abortive recombinants in J^+ x J^+ bacterial crosses.
Genet. Res. 13, 113-115
133. Mitsuhashi, S., Hashimoto, H., Harada, K., Egawa, R., Matsuyama, T. 1962
Studies on the Drug-Resistance of Enteric Bacteria.
7) Type of Transmissible Drug-Resistance Factor.
Gunma, J. med. Sci. 23, 59-65
134. Mitsuhashi, S., Takahashi, H. 1964
Drug Resistance of Enteric Bacteria. 19) Stability of the transmissible drug-resistance (R) factor in the Host cell.
Gunma, J. med. Sci. 4, 129-132
135. Mitsuhashi, S., Oshima, H.K., Kawaharada, U., Hashimoto, H. 1960
Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strains by mixed cultivations.
Jap. J. Experim. Med. 30, 179-184
136. Mitsuhashi, S. 1965
Transmissible drug-resistance factor R.
Gunma, J. med. Sci. 14, 169-173
137. Morrison, T., Malamy, M.H. 1970
Comparisons of F Factors and R Factors: Existence of Independent Regulation Groups in F Factors.
J. Bacteriol. 103, 81-88

138. Mossel, D.A.A., Vincentie, H. 1968
The Differential Enterobacteriogramme.
Lab. Pract. 17 (12), 1344-1346
139. Nagel de Zwaig, R., Anton, D., Puig, J. 1963
Sur le transfer des facteurs colicinogènes E2, I
et V dans la conjugation bactérienne.
C.r.Soc.Biol., Paris, 157 1815-1816
140. Natoli, D. 1969
La Resistenza Multipla Transmissibile Negli Enterobatteri.
Boll.Inst.sieroter milan. 48, 227-234
141. Nisioka, T., Mitani, M., Clowes, R.C. 1970
Moleculare Recombination Between R-Factor Desoxyribonucleic Acid Molecules in Escherichia coli Host Cells.
J.Bacteriol. 103, 166-177
142. Novick, R.P. 1969
Extrachromosomal Inheritance in Bacteria.
Bacteriol.Rev. 33, 210-263
143. Novaková, Z., Styková, S., Krčméry, V., Parraková, E. 1970
Occurence of colicinogenic strains among tetracyclin resistant strains of Escherichia coli.
Z.allg.Microbiol. 9, 399-400
144. Nordström, K. 1971
Increases Resistance to several Antibiotics by one Mutation in an R-factor, R 1a.
J.gen.Microbiol. 66, 205-214
145. Nygaard, G.S., Bissett, M.L., Wood, R.M. 1970
Laboratory Identification of Aeromonads.
Appl.Microbiol. 19, 618-620
146. Papavassiliou, J. 1960
Colicinogenie et sensibilite aux colicines des Escherichiae d'origines humaine et animale.
Arch.Inst.Pasteur, Tunis, 37, 103-106

147. Potham, F.J. 1955
Bakteriologische Studien über die Resistenz des
Mycobacterium tuberculosis gegen Streptomycin
und andere Tuberculostatika.
Ergebnisse Hyg.Bakt. 29, 248-393
148. Reeve, E.C.R. 1966
Characteristics of some single-step mutants to
Chloramphenicol resistance in Escherichia coli
K 12 and their interactions with R Factor Genes.
Genet.Res.Camb..7, 281-286
149. Rieck, G.W. 1971
Krankheitsresistenz und Krankheitsdisposition.
Tierzüchtungslehre z.Auflage ed.Sohberg, G.,
Ulmer Stuttgart
150. Roe, E., Jones, F.J., Lowbury, E.J.L. 1971
Transfer of Antibiotic Resistance between Pseudo-
monas Aeruginosa, Escherichia coli, and other Gram
negative Bacilli in Burns.
Lancet 23, 149-152
151. Rolle, M., Mayr, A. 1966
Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre.
Enke Verlag, Stuttgart, 90
152. Schmidt, H.L. 1968
Zur Mikrobiologie der Handelsfuttermittel.
Landwirtschaftl.Forsch. 21, 1-15
153. Schmidt, H.L. 1965
Über Keimbesatz und Keimverunreinigungen von Handels-
futtermitteln.
Getreide und Mehl 15, 28-34
154. Schneiderson, S. 1970
Antibiotic Susceptibility of Pathogenic Microorganisms
isolated in 1969.
New York State, J.Med. 70, 1871-1874
155. Schnitzer, R.J., Grundberg, E.G. 1968
Drug Resistance of microorganisms.
Acad.Press Inc., Publishes New York

156. Sevag, H.G., Yokota, T. 1960
Evolution of the phenomenon of drug-resistance.
III. The origin of the development of the resistance
to sulphathiazol in E.coli and Staph. aureus.
Proc. Roy. Soc. Lond. Ser.B 153, 220-226
157. Sherishorina, S. 1970
Transfer of resistance to Antibiotics by method of
conjugation.
Antibiotika 15, 247-250
158. Siccadi, A.G. 1969
Effect of R factors and other plasmids on ultra-
violet susceptibility and host cell reactivation
property of E. coli.
J. Bacteriol. 100, 337-343
159. Smith, D.H., Armour, S.E. 1969
Recovery of Resistance (R) Factor from a Drug free
Community.
Lancet 2, 774-776
160. Smith, H.W. 1970
The Incidence of transmissible antibiotic resistance
amongst Salmonella isolated from poultry in England
and Wales.
J. Med. Microbiol. 3, 181-182
161. Smith, H.W. 1968
Anti-microbial drugs in animal feeds.
Nature 218, 728-731
162. Smith, H.W. 1970
The transfer of Antibiotic Resistance between strains
of Enterobacteria in chicken, calves and pigs.
J. Med. Microbiol. 3, 165-180
163. Sneath, P.H.A. 1962
Sex-factors as episomes.
Brit. Med. Bull. 18, 41-46
164. Spicher, G. 1962
Die Ermittlung des Keimgehaltes von Getreide und Ge-
treideprodukten und ihre Problematik.
Brot und Gebäck 7, 124-134

165. Spicher, G. 1969
Beiträge zur Vereinheitlichung der Ermittlung
des Keimgehaltes von Getreide und Getreideprodukten.
Brot und Gebäck 23, 61-69
166. Spicher, G. 1963
Neue Gesichtspunkte bei der Klassifizierung der
Bakterienflora des Getreides und der Getreide-
produkte.
Vortrag, Getreidechemikertagung, Detmold
167. Spicher, G. 1966
Die Systematische Stellung der "Gelbstämme"
unter besonderer Berücksichtigung ihrer biochemi-
schen Eigenschaften.
Getreide und Mehl 16, 117-121
168. Stahl, F.W. 1969
Mechanismen der Vererbung.
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart
169. Stokstad, E.L.R., Jukes, T.H. 1962
Role of Antibiotics in the Nutrition of -chickens.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 523-534
170. Swanson, K.P., Merz, W., Young, J. 1970
Zytogenetik.
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart
171. Swann Report 1969
Swann dissects Antibiotics.
Nature 224, 835-836
172. Swann Report 1970
Swann Implemented.
Nature 227, 879
173. Sykes, R.B., Richmond, M.H. 1970
Intergeneric Transfer of a B-Lactamase Gene between
Ps.aeruginosa and E.coli.
Nature 226, 952-954
174. Thalmann, A. 1971
Veränderungen der Mikroflora von Futtermitteln bei
der Lagerung.
Landwirtschaftl.Forsch. 26, II.Sonderheft, S. 58-62

175. Tiews, J. 1970
Über die Auswirkung der Antibiotikafütterung
in der tierischen Produktion.
Mitt.Tierhaltung, 126, 7-9
176. Unowsky, J., Rachmeler, M. 1966
Mechanisms of antibiotic resistance determined
by resistance-transfer Factors.
J.Bacteriol. 92, 358-368
177. Voogd, C.E., Guinee, P.A.M., Manten, A., Valkenburg, J.J. 1970
Incidence of resistance to tetracycline, chloramphenicol and ampicillin among Salmonella species.
isolated in the Netherlands in 1967 and 1968.
Antonie van Leeuwenhoek 36, 297-304
178. Walter, A.M., Heilmeyer, L. 1969
Antibiotika-Fibel.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart
179. Watanabe, T., Fukasawa, T. 1960
Episome-mediated transfer of drug resistance in
Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors
by conjugation.
J.Bacteriol. 81, 669-682
180. Watanabe, T., Fukasawa, T. 1960
Episomic-mediated transfer of drug resistance in
Enterobacteriaceae. IV. Interaction between resistance transfer vector and F-factor in E.coli K 12.
J.Bacteriol. 83, 727-735
181. Watanabe, T., Fukasawa, T. 1963
Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria.
Bact.Rev. 27, 87-115
182. Watanabe, T. 1963
Episome-mediated transfer of drug resistance in
Enterobacteriaceae. VI. High-frequency resistance transfer system in E.coli.
J.Bacteriol. 85, 788-794

183. Watanabe,T., Ogata,Ch., Sato,S. 1964
Episomic-mediated transfer of drug resistance in
Enterobacteriaceae. VII. Six-drug-Resistance R-factor.
J.Bacteriol. 88, 922-928
184. Watanabe,T. 1966
Infectious drug-resistance in enteric bacteria.
New England,J.Med. 275, 880-912
185. Watanabe,T., Ogata,Y. 1970
Genetic Stability of Various R Factors in Escherichia
coli and S.typhimurium.
J.Bacteriol. 102, 363-368
186. WHO Berichte 210, 1961
Standardization of methods for conducting microbic
sensitivity tests.
Wld.Hlth Org. techn.Rep.Ser., No. 210
187. WHO Berichte 430, 1969
Specifications for the identity and purity of
food Additives and their toxicological evaluation:
some Antibiotics.
Wld.Hlth Org.techn.Rep.Ser., No. 430
188. Wiedemann,B., Knothe,H., Holzer,P. 1969
Untersuchungen über die Verbreitung von R-Faktoren.
Zentbl. Bakt.ParasitKde I Orig. 212, 97-103
189. Zeuthen,J., Pato,M.L. 1971
Replication of the F'lac Sex Factor in the Cell
Cycle of Escherichia coli.
Molec.Genetics 111, 242-255
190. Zinder,N.D. 1953
Infective heredity in bacteria.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 18, 261
191. Zinder,N.D., Lederberg,J. 1962
Genetic exchange in Salmonella.
J.Bacteriol. 64, 679-699

Frau Prof. Dr. B. Gedek bin ich für die Überlassung
des Themas und die wissenschaftlichen Anregungen,

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr für die mir jeder-
zeit gewährte Aussprache und seine Anteilnahme am
Gelingen der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Schels für seine freund-
liche Hilfe.

L E B E N S L A U F

Am 26. Februar 1946 wurde ich, Petra-Irmgard Ziebold, als Tochter des Tierarztes Dr. Herbert Ziebold und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Schindler, in Celle geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich ab 1957 das neusprachliche Gymnasium in Hankensbüttel, wo ich am 3. März 1965 die Reifeprüfung bestand. Im Sommersemester 1965 begann ich an der tierärztlichen Hochschule in Hannover mit dem Studium der Veterinärmedizin. Im Wintersemester 1966/67 setzte ich das Studium an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, fort und legte hier nach der vorgeschriebenen Praktikantenzeit das tierärztliche Staatsexamen ab. Die Approbation erhielt ich mit Wirkung vom 11. Dezember 1970.

